

10/528659
Rec'd PTO 22 MAR 2005
PCT/JP 03/12052

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

22.0

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 9月25日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-280034
[ST. 10/C]: [JP2002-280034]

FILED 06 NOV 2003

PCT

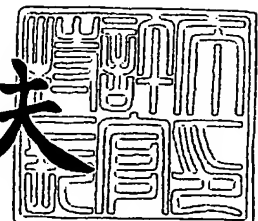
出 願 人
Applicant(s): 財団法人名古屋産業科学研究所
財団法人岐阜県国際バイオ研究所

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 C02007
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市緑区ほら貝 2-82-3 グローリアス
緑区ほら貝 702号

【氏名】 山田 芳司

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市緑区神の倉 3-98

【氏名】 横田 充弘

【特許出願人】

【持分】 003/004

【識別番号】 598091860

【氏名又は名称】 財団法人名古屋産業科学研究所

【特許出願人】

【持分】 001/004

【識別番号】 500572649

【氏名又は名称】 財団法人岐阜県国際バイオ研究所

【代理人】

【識別番号】 100114362

【弁理士】

【氏名又は名称】 萩野 幹治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 102751

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0200890

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 高血圧のリスク診断方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の工程(a)を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

(a) 核酸試料における、以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型、
- (2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型、
- (3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型、及び
- (4) G-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型。

【請求項 2】 以下の工程(b)を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

(b) 核酸試料における、以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (5) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-850位の多型、
- (6) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-238位の多型、
- (7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型、及び
- (8) グリコプロテインIb α 遺伝子の塩基番号1018位の多型。

【請求項 3】 以下の工程(i)～(iii)を含んでなる、高血圧のリスク診断方法、

(i) 核酸試料における、以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型、
- (2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型、
- (3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型、及び
- (4) G-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型、

(ii) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び

(iii) 決定された遺伝子型から高血圧の遺伝的リスクを求める工程。

【請求項 4】 以下の工程(iv)～(vi)を含んでなる、高血圧のリスク診断方法、

(iv) 核酸試料における、以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

(5) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-850位の多型、

(6) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-238位の多型、

(7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型、及び

(8) グリコプロテインIb α 遺伝子の塩基番号1018位の多型、

(v) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び

(vi) 決定された遺伝子型から高血圧の遺伝的リスクを求める工程。

【請求項 5】 以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型を解析するための核酸、

(2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型を解析するための核酸、

(3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型を解析するための核酸、及び

(4) G-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型を解析するための核酸。

【請求項 6】 以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(5) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-850位の多型を解析するための核酸、

(6) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-238位の多型を解析するための核酸、

(7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型を解析するための核酸、及び

(8) グリコプロテインIb α 遺伝子の塩基番号1018位の多型を解析するための核酸。

【請求項 7】 以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸が不溶性支持体に固定されてなる固定化核酸、

(1)グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型を解析するための核酸

(2)ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型を解析するための核酸、

(3)アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型を解析するための核酸、及び

(4)G-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型を解析するための核酸。

【請求項 8】 以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸が不溶性支持体に固定されてなる固定化核酸、

(5)腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-850位の多型を解析するための核酸、

(6)腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-238位の多型を解析するための核酸、

(7)インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型を解析するための核酸、及び

(8)グリコプロテインIb α 遺伝子の塩基番号1018位の多型を解析するための核酸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は高血圧に関連する遺伝子を利用した検出方法に関する。詳しくは高血圧に関連する複数の遺伝子の多型を利用した検出方法及び該方法に用いられるキットに関する。高血圧を発症するリスクを求めることに本発明を利用できる。

【0002】

【従来の技術】

高血圧は多因子疾患であり、個人個人の遺伝的背景と多様な環境因子の相互作用により発症が規定される（非特許文献1）。高血圧は冠動脈疾患、脳卒中、慢性腎疾患の主要な危険因子であるため、高血圧の予防は社会的・公衆衛生学的に重要である。高血圧を予防するための一つの方法は高血圧感受性遺伝子を同定す

ることである。連鎖解析（非特許文献2～4）および候補遺伝子による関連解析（非特許文献5～8）により、高血圧と関連する染色体上のいくつかの遺伝子座および候補遺伝子群が同定された。今までにゲノム疫学的研究によりアンギオテンシノーゲン（非特許文献5）、 α -アデューシン（非特許文献6）、Gタンパク質 β 3サブユニット（非特許文献7）、および β 2アドレナリン受容体（非特許文献8）などの遺伝子多型と高血圧罹患との関連が報告されているが、高血圧感受性遺伝子は未だ十分に同定されていない。さらに、異なる人種では異なるゲノム多型を有するため、それぞれの人種で多型と高血圧との関連についてのデータベースを構築することが重要である。

【0003】

【非特許文献1】

Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*. 2001;104:545-556.

【非特許文献2】

Xu X, Rogus JJ, Terwedow HA, Yang J, Wang Z, Chen C, Niu T, Wang B, Xu H, Weiss S, Schork NJ, Fang Z. An extreme-sib-pair genome scan for genes regulating blood pressure. *Am J Hum Genet*. 1999;64:1694-1701.

【非特許文献3】

Krushkal J, Ferrell R, Mockrin SC, Turner ST, Sing CF, Boerwinkle E. Genome-wide linkage analysis of systolic blood pressure using highly discordant siblings. *Circulation*. 1999;99:1407-1411.

【非特許文献4】

Rice T, Rankinen T, Province MA, Chagnon YC, Perusse L, Borecki IB, Boerwinkle E, Rao DC. Genome-wide linkage analysis of systolic and diastolic blood pressure: the Quebec Family Study. *Circulation*. 2000;102:1956-1963.

【非特許文献5】

Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel J-M, Corvol P. Molecula

r basis of human hypertension: role of angiotensinogen. Cell. 1992;71:169-180.

【非特許文献 6】

Cusi D, Barlassina C, Azzani T, Casari G, Citterio L, Devoto M, Glorioso N, Lanzani C, Manunta P, Righetti M, Rivera R, Stella P, Troffa C, Zagato L, Bianchi G. Polymorphisms of α -adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. Lancet. 1997;349:1353-1357.

【非特許文献 7】

Siffert W, Rosскоп D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann H-E, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein β_3 subunit variant with hypertension. Nat Genet. 1998;18:45-48.

【非特許文献 8】

Bray MS, Krushkal J, Li L, Ferrell R, Kardia S, Sing CF, Turner ST, Boerwinkle E. Positional genomic analysis identifies the β_2 -adrenergic receptor gene as a susceptibility locus for hypertension. Circulation. 2000;101:2877-2882.

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

以上のように、今までに数多くの遺伝子多型と高血圧との関連解析が行われてきた。しかし多くの研究についてはその意義について一定の見解は得られていない。その主な理由は多くの研究においては対象集団の大きさが十分でないことと、遺伝子多型のみならず環境因子が人種間で異なっていることに起因する。さらに、たとえ高血圧との関連が認められたとしても、大規模集団における解析では相対危険度（オッズ比）が低いのが一般的である。

本発明は以上の背景に鑑みなされたものであって、その目的は高精度で予知確率の高い高血圧の遺伝子リスクを診断する手段を提供し、高血圧の一次予防に貢献することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、以上の目的を達成するために数種類の公的データベースを用いて冠動脈硬化、冠動脈攣縮、高血圧、糖尿病、高脂血症などとの関連が推定される71遺伝子を抜粋し、遺伝子の機能変化との関連が予想されるものなどを中心に112多型を選択した。続いて、この71遺伝子112多型に関して心筋梗塞との関連解析を心筋梗塞445例と対照464例について行い、男性で19個、女性で18個の一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) が心筋梗塞発症と関連することを見出したが (Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, et al. Prediction of risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. N Engl J Med. in press.)、それらの多型群の中には高血圧の候補遺伝子も含まれていた。そこで、これらのSNPと高血圧との関連について大規模関連解析を行った。その結果、高血圧と関連するSNPを男性で4個、女性で4個同定することに成功した。更に、これらの多型を組み合わせて解析する多項ロジスティック回帰分析のstepwise forward selection methodにより、最大オッズ比が男性で5.34、女性で46.86を呈し、過去に報告された関連解析の中で最大のオッズ比を示した。この結果から、これらのSNPの中から複数のSNPを選択し、各SNPを解析した結果を組み合わせて用いれば、信頼性が高く、予知確率の高い高血圧のリスク診断が行えるとの知見が得られた。本発明は以上の知見に基づくものであって、次の構成を提供する。

[1] 以下の工程(a)を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

(a) 核酸試料における、以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型、
- (2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型、
- (3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型、及び
- (4) G-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型。

[2] 以下の工程(b)を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

(b) 核酸試料における、以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (5) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-850位の多型、
- (6) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-238位の多型、
- (7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型、及び
- (8) グリコプロテインIb α 遺伝子の塩基番号1018位の多型。

[3] 以下の工程(i)～(iii)を含んでなる、高血圧のリスク診断方法、

(i) 核酸試料における、以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型、
- (2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型、
- (3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型、及び
- (4) G-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型、

(ii) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び

(iii) 決定された遺伝子型から高血圧の遺伝的リスクを求める工程。

[4] 以下の工程(iv)～(vi)を含んでなる、高血圧のリスク診断方法、

(iv) 核酸試料における、以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (5) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-850位の多型、
- (6) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-238位の多型、
- (7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型、及び
- (8) グリコプロテインIb α 遺伝子の塩基番号1018位の多型、

(v) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び

(vi) 決定された遺伝子型から高血圧の遺伝的リスクを求める工程。

[5] 以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型を解析するための核酸

(2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型を解析するための核酸、

(3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型を解析するための核酸、及び

(4) G-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型を解析するための核酸。

[6] 以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(5) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-850位の多型を解析するための核酸、

(6) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-238位の多型を解析するための核酸、

(7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型を解析するための核酸、及び

(8) グリコプロテインIb α 遺伝子の塩基番号1018位の多型を解析するための核酸。

[7] 以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸が不溶性支持体に固定されてなる固定化核酸、

(1) グリコプロテインIa遺伝子の塩基番号1648位の多型を解析するための核酸

(2) ケモカイン受容体2遺伝子の塩基番号190位の多型を解析するための核酸、

(3) アポリポプロテインC-III遺伝子の塩基番号1100位の多型を解析するための核酸、及び

(4) G-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の塩基番号825位の多型を解析するための核酸。

[8] 以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸が不溶性支持体に固定されてなる固定化核酸、

(5) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-850位の多型を解析するための核酸、

(6) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-238位の多型を解析するための核酸、

(7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位の多型を解析するための核酸、及び

(8) グリコプロテインIb α 遺伝子の塩基番号1018位の多型を解析するための核酸。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明の第1の局面は核酸試料の遺伝子型を検出する方法に関し、その一態様は以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程を含むことを特徴とする。他の態様としては、以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程を含むことを特徴とする。尚、以上の工程の結果得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定することにより高血圧の遺伝的リスクを求めることができる。

(1)グリコプロテインIa (Glycoprotein Ia) 遺伝子の塩基番号1648位の多型: 1648A→G (以下、「GPIa(1648A→G)多型」ともいう)

(2)ケモカイン受容体2 (Chemokine receptor 2) 遺伝子の塩基番号190位の多型: 190G→A (以下、「CCR2(190G→A)多型」ともいう)

(3)アポリポプロテインC-III (Apolipoprotein C-III) 遺伝子の塩基番号1100位の多型: 1100C→T (以下、「ApoC-III(1100C→T)多型」ともいう)

(4)G-タンパク質 β 3サブユニット (G-protein β 3 subunit) 遺伝子の塩基番号825位の多型: 825C→T (以下、「GP β 3(825C→T)多型」ともいう)

(5)腫瘍壊死因子 α (Tumor necrosis factor- α) 遺伝子の塩基番号-850位の多型: -850C→T (以下、「TNF α (-850C→T)多型」ともいう)

(6)腫瘍壊死因子 α (Tumor necrosis factor- α) 遺伝子の塩基番号-238位の多型: -238G→A (以下、「TNF α (-238G→A)多型」ともいう)

(7)インスリン受容体サブストレート1 (Insulin receptor substrate-1) 遺伝子の塩基番号3494位の多型: 3494G→A (以下、「IRS-1(3494G→A)多型」ともいう)

(8)グリコプロテインIb α (Glycoprotein Ib α) 遺伝子の塩基番号1018位の多型: 1018C→T (以下、「GPIb α (1018C→T)多型」ともいう)

【0007】

以上において1648A→Gのような表記は、当該塩基番号位置の多型が矢印の前又は後の塩基である二つの遺伝子型からなることを意味する。

【0008】

各遺伝子における塩基番号は公共のデータベースであるGenBank (NCBI) に登録されている公知の配列を基準として表される。尚、配列番号1の塩基配列 (Accession No. X17033 M28249: Human mRNA for integrin alpha-2 subunit) において1648番目の塩基がグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基に相当する。同様に配列番号2の塩基配列 (Accession No. U95626: Homo sapiens ccr2b (ccr2), ccr2a (ccr2), ccr5 (ccr5) and ccr6(ccr6) genes, complete cds, and lactoferrin (lactoferrin) gene, partial cds, complete sequence (但し、配列番号2の配列は50,000番目までの配列)) において46295番目の塩基がケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基に相当し、配列番号3の塩基配列 (Accession No. X01392: Human apolipoprotein CIII gene and apo AI-apo CIII intergenic) において1100番目の塩基がアポリポプロテインC-III遺伝子の1100位塩基に相当し、配列番号4の塩基配列 (Accession No. M31328: Human guanine nucleotide-binding protein beta-3 subunit mRNA, complete cds.) において831番目の塩基がG-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の825位塩基に相当し、配列番号5の塩基配列 (Accession No. L11698: Homo sapiens tumor necrosis factor alpha gene, promoter region.) において203番目の塩基が腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-850位塩基に相当し、配列番号5の塩基配列 (Accession No. L11698: Homo sapiens tumor necrosis factor alpha gene, promoter region.) において816番目の塩基が腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-238位塩基に相当し、配列番号6の塩基配列 (Accession No. S85963: hIRS-1=rat insulin receptor substrate-1 homolog [human, cell line FOCUS, Genomic, 6152 nt].) において3494番目の塩基がインスリン受容体サブストレート1遺伝子の塩基番号3494位塩基に相当し、配列番号7の塩基配列 (Accession No. J02940: Human platelet glycoprotein Ib alpha chain mRNA, complete cds.) において524番目の塩基がグリコプロテインIb α 遺伝子の1018位塩基に相当する。

【0009】

本発明において「多型を解析する」とは、解析対象の遺伝子多型について核酸試料がどのような遺伝子型を有するかを調べることを意味し、多型が存在する位置の塩基（塩基配列）を調べることと同義である。典型的には、GPIa(1648A→G)多

型の解析を例に採れば、核酸試料におけるグリコプロテインIaの遺伝子型がAA（1648位塩基が両アレル共にAのホモ接合体）、AG（1648位塩基がAのアレルとGのアレルとのヘテロ接合体）、及びGG（1648位塩基が両アレル共にGのホモ接合体）の中のいずれであるかを調べることを意味する。

【0010】

上記の(1)～(4)の多型は、後述の実施例で示されるように、日本人男性を対象とした解析において高血圧の遺伝的リスクの判定に利用することが特に有効と認められた多型である。従ってこれらの多型を解析対象とすることは、被験者として男性（特に日本人男性）を採用するときに、より高精度で予知確率の高い診断を可能とする。

【0011】

同様に上記の(5)～(8)の多型は、後述の実施例で示されるように、日本人女性を対象とした解析において高血圧の遺伝的リスクの判定に利用することが特に有効と認められた多型である。従ってこれらの多型を解析対象とすることは、被験者として女性（特に日本人女性）を採用するときに、より高精度で予知確率の高い診断を可能とする。

【0012】

ここで、原則的には解析する多型の数の増加に比例して核酸試料の遺伝子型がより細かく分類され、これによって一層予知確率の高い高血圧の遺伝的リスクの診断を行うことができる。かかる見地から、上記の(1)～(4)の多型の中でより多くの多型を解析して遺伝子型を検出することが好ましい。従って、(1)～(4)のすべての多型を解析することが最も好ましい。三つ以下の多型を組み合わせる遺伝子型の検出を行う場合には、後述の実施例で示されるオッズ比の高い多型を優先的に選択して用いることが好ましい。例えば三つの多型を組み合わせる用いるのであれば、オッズ比が上位である三つの多型、即ち(2)、(3)、及び(4)を選択することが好ましい。同様に例えば二つの多型を組み合わせる用いるのであれば(2)及び(4)を選択することが好ましい。

【0013】

(5)～(8)の多型から選択される二つ以上の多型を解析する場合も同様に、これ

らすべての多型、即ち四つの多型を解析することが最も好ましい。三つ以下の多型を組み合わせることで遺伝子型の検出を行う場合には、後述の実施例で示されるオッズ比の高い多型を優先的に選択して用いることが好ましい。例えば三つの多型を組み合わせるのであれば(5)、(7)、及び(8)を選択することが好ましい。同様に例えば二つの多型を組み合わせるのであれば(5)及び(7)を選択することが好ましい。

【0014】

各遺伝子多型を解析する方法は特に限定されるものではなく例えばアレル特異的プライマー（及びプローブ）を用い、PCR法による増幅、及び増幅産物の多型を蛍光又は発光によって解析する方法や、PCR(polymerase chain reaction)法を利用したPCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism: 制限酵素断片長多型)法、PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism: 単鎖高次構造多型)法(Orita, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86, 2766-2770 (1989)等)、PCR-SSO(specific sequence oligonucleotide: 特異的配列オリゴヌクレオチド)法、PCR-SSO法とドットハイブリダイゼーション法を組み合わせたASO(allele specific oligonucleotide: アレル特異的オリゴヌクレオチド)ハイブリダイゼーション法(Saiki, Nature, 324, 163-166(1986)等)、又はTaqMan-PCR法(Livak, KJ, Genet Anal, 14, 143(1999), Morris, T. et al., J. Clin. Microbiol., 34, 2933(1996)), Invader法(Lyamichev V et al., Nat Biotechnol, 17, 292 (1999)), プライマー伸長法を用いたMALDI-TOF/MS(matrix)法(Haff LA, Smirnov IP, Genome Res 7, 378(1997)), RCA(rolling cycle amplification)法(Lizardi PM et al., Nat Genet 19, 225(1998)), DNAチップ又はマイクロアレイを用いた方法(Wang DG et al., Science 280, 1077(1998)等)、プライマー伸長法、サザンブロットハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法(Southern, E., J. Mol. Biol. 98, 503-517(1975))等、公知の方法を採用できる。さらに、解析対象の多型部分を直接シーケンスすることにより解析してもよい。尚、これらの方法を任意に組み合わせることで多型解析を行ってもよい。

【0015】

核酸試料が少量の場合には検出感度ないし精度の面からPCR法を利用した方法

(例えばPCR-RFLP法)により解析することが好ましい。また、PCR法又はPCR法を応用した方法などの遺伝子増幅法により核酸試料を予め増幅(核酸試料の一部領域の増幅を含む)した後、上記いずれかの解析方法を適用することもできる。

一方、多数の核酸試料を解析する場合には、アリル特異的PCR法、アリル特異的ハイブリダイゼーション法、TaqMan-PCR法、Invader法、プライマー伸長法を用いたMALDI-TOF/MS(matrix)法、RCA(rolling cycle amplification)法、又はDNAチップ又はマイクロアレイを用いた方法等、多数の検体を比較的短時間で解析することが可能な解析方法を用いることが特に好ましい。

【0016】

以上の方法では、各方法に応じたプライマーやプローブ等の核酸(本発明において、「多型解析用核酸」ともいう)が使用される。多型解析用核酸の例としては、解析対象の多型を含む遺伝子において、当該多型部位を含む一定領域(部分DNA領域)に相補的な配列を有する核酸を挙げることができる。また、解析対象の多型を含む遺伝子において当該多型部位を含む一定領域(部分DNA領域)に相補的な配列を有し、当該多型部分を含むDNAフラグメントを特異的に増幅できるように設計された核酸(プライマー)を挙げることができる。このような核酸としては、例えばグリコプロテインIa遺伝子の1648位の多型が解析対象の場合には1648位の塩基がA(アデニン)であるグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は1648位の塩基がG(グアニン)であるグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸が該当する。

【0017】

多型解析用核酸の他の具体例としては、解析対象の多型部位がいずれかの遺伝子型である場合にのみ当該多型部位を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットを挙げることができる。より具体的には解析対象の多型部位を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、多型部位がいずれかの遺伝子型であるアンチセンス鎖の当該多型部位を含む部分DNA領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、センス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーとか

らなる核酸セットを例示することができる。このような核酸セットとしてはグリコプロテインIa遺伝子の1648位の多型が解析対象の場合には、グリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、1648位塩基がA（アデニン）であるグリコプロテインIa遺伝子のアンチセンス鎖において1648位塩基を含む部分DNA領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、センス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーとからなる核酸セット、又は1648位塩基がG（グアニン）であるグリコプロテイン遺伝子のアンチセンス鎖において1648位塩基を含む部分DNA領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、センス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーとからなる核酸セットが該当する。ここで、増幅される部分DNA領域の長さはその検出に適した範囲で適宜設定され例えば50bp～200bp、好ましくは80bp～150bpである。より具体的には例えば、GPIa(1648A→G)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。尚、以下の配列の下線部は多型に対応する部分を表す。また、配列中のNはA、T、C、及びGのいずれかであることを意味する。

【0018】

センスプライマー

GAGTCTACCTGTTTACTATCAANAA：配列番号8、又はGAGTCTACCTGTTTACTATCAANGA：配列番号9

アンチセンスプライマー

ACCAGTACTAAAGCAAATTAAACT：配列番号10

【0019】

同様に、CCR2(190G→A)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

アンチセンスプライマー

GCAGTTTATTAAGATGAGGNCG：配列番号11、又はTTGCAGTTTATTAAGATGAGGNTG：配列番号12

センスプライマー

GGTGCTCCCTGTCATAAATTTGA: 配列番号 13

【0020】

同様に、ApoC-III(1100C→T)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

センスプライマー

CCTTCTCAGCTTCATGCAGG: 配列番号 14、

アンチセンスプライマー

GTCTTGGTGGCGTGCTTCA: 配列番号 15

【0021】

同様に、GPβ3(825C→T)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

センスプライマー

TCTGCGGCATCACGTNCG: 配列番号 16、又は

TCTGCGGCATCACGTNTG: 配列番号 17

アンチセンスプライマー

GAATAGTAGGCGGCCACTGA: 配列番号 18

【0022】

同様に、TNFα(-850C→T)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

アンチセンスプライマー

TCTACATGGCCCTGTCTTNGT: 配列番号 19、又は

CTCTACATGGCCCTGTCTTNAT: 配列番号 20

センスプライマー

CTCTACATGGCCCTGTCTTTAT: 配列番号 21

【0023】

同様に、TNFα(-238G→A)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

アンチセンスプライマー

CCCCATCCTCCCTGCTNCG: 配列番号 22、又は

CCCCATCCTCCCTGCTNIG: 配列番号 23

センスプライマー

AGTCAGTGGCCCAGAAGACC: 配列番号 24

【0024】

同様に、IRS-1(3494G→A)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

センスプライマー

GGGCCCTGCACCTCCNGG: 配列番号 25、又は

GGGCCCTGCACCTCCNAG: 配列番号 26

アンチセンスプライマー

GGGTAGGCCTGCAAATGCTA: 配列番号 27

【0025】

同様に、GPIb α (1018C→T)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

センスプライマー

CCCAGGGCTCCTGNCG: 配列番号 28、又は

CCCCAGGGCTCCTGNTG: 配列番号 29

アンチセンスプライマー

TGAGCTTCTCCAGCTTGGGTG: 配列番号 30

【0026】

一方、プローブの具体例として以下のものを挙げることができる。

ApoC-III(1100C→T)多型解析用プローブとして

CAGCTTCATGCAGGGCTACA: 配列番号 31、又は

CAGCTTCATGCAGGGTTACA: 配列番号 32。

【0027】

TNF α (-850C→T)多型解析用プローブとして

ACATGGCCCTGTCTTNGTTAAG: 配列番号 33、又は

ACATGGCCCTGTCTTNATTAAG: 配列番号 34。

【0028】

IRS-1(3494G→A)多型解析用プローブとして

CACCTCCNGGGGCTGCTAG: 配列番号 35、又は

CACCTCCNAGGGCTGCTAG: 配列番号 36。

【0029】

以上の核酸プライマー、核酸プローブは単なる一例であって、核酸プライマーであれば目的の増幅反応を支障なく行える限度において、他方核酸プローブであれば目的のハイブリダイゼーション反応を支障なく行える限度において一部の塩基配列に改変が施されたものであってもよい。ここでの「一部の改変」とは、塩基の一部が欠失、置換、挿入及び／又は付加されていることを意味する。改変にかかる塩基数は例えば1～7個、好ましくは1～5個、更に好ましくは、1～3個である。尚、このような改変は、原則として多型部位に対応する塩基以外の部分において行われる。

【0030】

多型解析用核酸（プローブ、プライマー）には、解析方法に応じて適宜DNA断片又はRNA断片が用いられる。多型解析用核酸の塩基長はそれぞれの機能が発揮される長さであればよく、プライマーとして用いられる場合の塩基長の例としては10～50bp程度、好ましくは15～40bp程度、更に好ましくは15～30bp程度である。

尚、プライマーとして用いられる場合には増幅対象に特異的にハイブリダイズし、目的のDNAフラグメントを増幅することができる限り鋳型となる配列に対して多少のミスマッチがあってもよい。プローブの場合も同様に、検出対象の配列と特異的なハイブリダイズが行える限り、検出対象の配列に対して多少のミスマッチがあってもよい。ミスマッチの程度としては、1～数個、好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個である。

多型解析用核酸（プライマー、プローブ）はホスホジエステル法など公知の方法によって合成することができる。尚、多型解析用核酸の設計、合成等に関しては成書（例えばMolecular Cloning, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）を参考にすることができる。

【0031】

本発明における多型解析用核酸を予め標識物質で標識しておくことができる。このような標識化核酸を用いることにより例えば、増幅産物の標識量を指標として多型の解析を行うことができる。また、多型を構成する各遺伝子型の遺伝子における部分DNA領域をそれぞれ特異的に増幅するように設計された2種類のプライマーを互いに異なる標識物質で標識しておけば、増幅産物から検出される標識物質及び標識量によって核酸試料の遺伝子型を判別できる。このような標識化プライマーを用いた検出方法の具体例としては、多型を構成する各遺伝子型のセンス鎖にそれぞれ特異的にハイブリダイズする2種類の核酸プライマー（アリル特異的センスプライマー）をフルオレセインイソチオシアネートとテキサスレッドでそれぞれ標識し、これら標識化プライマーとアンチセンス鎖に特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーとを用いて多型部位を含む部分DNA領域を増幅し、得られた増幅産物における各蛍光物質の標識量を測定して多型を検出する方法を挙げることができる。尚、ここでのアンチセンスプライマーを例えばビオチンで標識しておけば、ビオチンとアビジンとの特異的な結合を利用して増幅産物の分離を行うことができる。

【0032】

多型解析用核酸の標識に用いられる標識物質としては ^{32}P などの放射性同位元素、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、テキサスレッドなどの蛍光物質を例示でき、標識方法としてはアルカリフォスファターゼ及びT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いた5'末端標識法、T4 DNAポリメラーゼやKlenow断片を用いた3'末端標識法、ニックトランスレーション法、ランダムプライマー法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 9, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）などを例示できる。

以上の多型解析用核酸を不溶性支持体に固定化した状態で用いることもできる。固定化に使用する不溶性支持体をチップ状、ビーズ状などに加工しておけば、これら固定化核酸を用いて多型の解析をより簡便に行うことができる。

【0033】

核酸試料は、被験者の血液、皮膚細胞、粘膜細胞、毛髪等から公知の抽出方法、精製方法を用いて調製することができる。多型解析対象の遺伝子を含むもので

あれば、任意の長さのゲノムDNAを核酸試料として用いることができる。また、必ずしも解析対象の遺伝子のすべてが一の核酸上に存在する核酸試料を用いる必要はない。即ち、本発明の核酸試料としては、解析対象の遺伝子のすべてが一の核酸上に存在しているもの、解析対象の遺伝子が二以上の核酸上に分かれて存在しているもののいずれをも用いることができる。尚、核酸試料において解析対象の遺伝子が完全な状態（即ち、遺伝子の全長が存在する状態）でなくとも、少なくとも解析される多型部位が存在している限りにおいて断片的、部分的な状態であってもよい。

【0034】

各遺伝子多型の解析は遺伝子多型ごとに、又は複数若しくは全部を同時に行う。前者の場合としては例えば、被験者から得た核酸試料を解析対象の多型の数に合わせて分注し、各多型の解析を個別に行う。後者の場合としては例えば、DNAチップまたはマイクロアレイによって行うことができる。尚、ここでいう同時とは解析過程のすべての操作が同時に行われることのみを意味するのではなく、一部の操作（例えば核酸増幅操作、プローブのハイブリダイズ、又は検出）が同時に行われる場合も含む。

【0035】

解析対象の遺伝子の転写産物であるmRNAを利用して各遺伝子の多型を解析することもできる。例えば被験者の血液、尿等から解析対象である遺伝子のmRNAを抽出、精製した後、ノーザンブロット法 (Molecular Cloning, Third Edition, 7.42, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)、ドットブロット法 (Molecular Cloning, Third Edition, 7.46, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)、RT-PCR法 (Molecular Cloning, Third Edition, 8.46, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)、DNAチップ (DNAアレイ) を用いた方法などを実行することにより、mRNAを出発材料として多型解析を行うことができる。

【0036】

さらに、上記の多型の中でアミノ酸の変化を伴うものについては、解析対象の遺伝子の発現産物を用いて多型解析を行うこともできる。この場合、多型部位に

対応するアミノ酸を含んでいる限り、部分タンパク質、部分ペプチドであっても解析用試料として用いることができる。

【0037】

このような遺伝子の発現産物を用いて解析する方法としては、多型部位のアミノ酸を直接分析する方法、又は立体構造の変化を利用して免疫学的に分析する方法などが挙げられる。前者としては、周知のアミノ酸配列分析法（エドマン法を利用した方法）を用いることができる。後者としては、多型を構成するいずれかの遺伝子型を有する遺伝子の発現産物に特異的な結合活性を有するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いた、ELISA法（酵素結合免疫吸着定量法）、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降法、免疫拡散法等などを用いることができる。

【0038】

以上説明した本発明の検出方法を実行することにより得られる多型情報を、高血圧の遺伝的リスクの診断に利用することができる。即ち、本発明は以上の検出方法によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び決定された核酸試料の遺伝子型から遺伝的リスクを求める工程を含んでなる、高血圧のリスク診断方法も提供する。ここでの遺伝子型の決定は、典型的には、検出対象の多型に関して核酸試料の両アレルがいずれの遺伝子型をそれぞれ有するかを決定することである。GPIa(1648A→G)多型が検出対象である場合を例に採れば、典型的には核酸試料におけるGPIaの遺伝子型がAA（1648位塩基が両アレル共にAのホモ接合体）、AG（1648位塩基がAのアレルとGのアレルとのヘテロ接合体）、及びGG（1648位塩基が両アレル共にGのホモ接合体）の中のいずれであるかを決定することである。

【0039】

後述の実施例で得られた結果を考慮すれば、高精度かつ予知確率の高い高血圧の遺伝的リスクの診断を可能とするために、例えばGPIa(1648A→G)多型であれば核酸試料の遺伝子型がGGであるか、それともAA又はAGのいずれかであるかが決定される。同様にCCR2(190G→A)多型であればAAであるか、それともGG又はGAのいずれかであるか、ApoC-III(1100C→T)多型であればTTであるか、それともCC又は

CTのいずれかであるか、GP β 3(825C→T)多型であればCT又はTTのいずれかであるか、それともCCであるか、TNF α (-850C→T)多型であればTTであるか、それともC又はCTのいずれかであるか、TNF α (-238G→A)多型であればGA又はAAのいずれかであるか、それともGGであるか、IRS-1(3494G→A)多型であればGA又はAAのいずれかであるか、それともGGであるか、GPIIb α (1018C→T)多型であればCT又はTTのいずれかであるか、それともCCであるかが決定される。

【0040】

高血圧の遺伝的リスクを診断することにより、将来的に高血圧を罹患するおそれの程度（発症し易さ）、即ち発症リスク（発症脆弱性）が予測され、また遺伝子型という客観的指標に基づいて高血圧の認定や病状の把握を行うことが可能となる。換言すれば、本発明の診断方法によって高血圧の発症リスクの評価、高血圧に罹患していることの認定、又は症状の把握を行うことができる。中でも発症リスクの評価を行えることは临床上極めて有意義である。発症リスクを事前に知ることが高血圧の一次予防に貢献し、適切な予防措置を講じることを可能とするからである。

本発明の診断方法によって得られる情報は、適切な治療法の選択や、予後の改善、患者のQOL（クオリティー・オブ・ライフ）の向上、又は発症リスクの低減などに利用することができる。

【0041】

本発明の診断方法を実行することにより、高血圧の発症リスク等をモニターすることができる。このようなモニターの結果、ある外的因子（環境因子、薬剤の投与など）と発症リスク等の増加との間に相関関係が認められれば、当該外的因子を危険因子と認定し、この情報を基に発症リスク等の低減を図ることが可能と考えられる。

【0042】

本発明で得られる高血圧の発症に関連する遺伝情報は高血圧の治療（予防的処置を含む）に利用され得る。例えば、本発明の診断方法を実施した結果、解析対象の高血圧の発症リスクを高める遺伝子型であった場合に、発症リスクの低い遺伝子型を有する遺伝子を生体内に導入して発現させれば、当該遺伝子が発現する

ことによって症状の軽減、発症の抑制、発症リスクの軽減などを期待できる。発症リスクの高い遺伝子型を有する遺伝子のmRNAに対するアンチセンス鎖を導入し、当該mRNAの発現を抑制する方法によっても、同様の治療効果が期待される。

【0043】

遺伝子又はアンチセンス鎖の導入は例えば、遺伝子導入用プラスミド又はウイルスベクターを用いた方法、エレクトロポレーション(Potter, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7161-7165(1984))、超音波マイクロバブル(Lawrie, A., et al. Gene Therapy 7, 2023-2027 (2000))、リポフェクション(Felgner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7413-7417(1984))、マイクロインジェクション(Graessmann, M. & Graessmann, A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 366-370(1976))等の方法により行うことができる。これらの方法を利用して所望の遺伝子などを生体に対して直接的に導入(in vivo法)又は間接的に導入(ex vivo法)することができる。

【0044】

本発明の第2の局面は、上述した本発明の検出方法又は診断方法に使用されるキット(遺伝子型検出用キット、又は高血圧診断用キット)を提供する。かかるキットには上記の(1)~(4)の多型からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析するための核酸(多型解析用核酸)が含まれる。他の態様としては上記の(5)~(8)の多型からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析するための核酸(多型解析用核酸)を含んでキットが構築される。

多型解析用核酸は、それが適用される解析方法(上述したアリル特異的核酸等を用いたPCR法を利用する方法、PCR-RFLP法、PCR-SSCP、TaqMan-PCR法、Invader法等)において、解析対象の多型部分を含むDNA領域又はそれに対応するmRNAを特異的に増幅できるもの(プライマー)又は特異的に検出できるもの(プローブ)として設計される。以下に本発明において提供されるキットの具体例を示す。

【0045】

以下の(1)~(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1)1648位塩基がAであるグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DN

A領域に相補的な配列を有する核酸、又は1648位塩基がGであるグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、

(2)190位塩基がGであるケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は190位がAであるケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、

(3)1100位がCであるアポリポプロテインC-III遺伝子の1100位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は1100位塩基がTであるアポリポプロテインC-III遺伝子の1100位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、及び

(4)825位塩基がCであるG-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の825位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は825位塩基がTであるG-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の-482位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸。

以上では、(1)～(4)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(1)～(4)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(2)～(4)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

【0046】

以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(5)-850位塩基がCである腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-850位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は-850位塩基がTである腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-850位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、

(6)-238位塩基がGである腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-238位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は-238位塩基がAである腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-238位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、

(7)3494位塩基がGであるインスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩

基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は3494位塩基がAであるインスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、及び

(8) 1018位塩基がCであるグリコプロテインIb α 遺伝子の1018位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸、又は1018位塩基がTであるグリコプロテインIb α 遺伝子の1018位塩基を含む部分DNA領域に相補的な配列を有する核酸。

以上では、(5)～(8)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(5)～(8)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(5)、(7)、及び(8)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

【0047】

以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1) 核酸試料中のグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基がAである場合にのみ、該グリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基がGである場合にのみ、該グリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(2) 核酸試料中のケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基がGである場合にのみ、該ケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基がAである場合にのみ、該ケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(3) 核酸試料中のアポリポプロテインC-III遺伝子の1100位塩基がCである場合にのみ、該アポリポプロテインC-III遺伝子の1100位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のアポリポプロテインC-III遺伝子の1100位塩基がTである場合にのみ、アポリポプロテインC-III

遺伝子の1100位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、及び

(4)核酸試料中のG-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の825位塩基がCである場合にのみ、該G-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の825位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のG-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の825位塩基がTである場合にのみ、該G-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の825位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット。

以上では、(1)～(4)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(1)～(4)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(2)～(4)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

【0048】

以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(5)核酸試料中の腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-850位塩基がCである場合にのみ、該腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-850位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中の腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-850位塩基がTである場合にのみ、該腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-850位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(6)核酸試料中の腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-238位塩基がGである場合にのみ、該腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-238位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中の腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-238位塩基がAである場合にのみ、該腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-238位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(7)核酸試料中のインスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基がGである場合にのみ、該インスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基を含

む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のインスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基がAである場合にのみ、該インスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、及び

(8)核酸試料中のグリコプロテインIb α 遺伝子の1018位塩基がCである場合にのみ、該グリコプロテインIb α 遺伝子の1018位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のグリコプロテインIb α 遺伝子の1018位塩基がTである場合にのみ、該グリコプロテインIb α 遺伝子の1018位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット。

以上では、(5)～(8)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(5)～(8)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(5)、(7)、及び(8)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

【0049】

以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1)グリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、1648位塩基がAであるグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は1648位塩基がGであるグリコプロテインIa遺伝子において1648位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、グリコプロテインIa遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(2)ケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、190位塩基がGであるケモカイン受容体2遺伝子において190位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマー及び／又は190位塩基がAであるケモカイン受容体

2遺伝子において190位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、ケモカイン受容体2遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(3) アポリポrotein C-III遺伝子の1100位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、及び

(4) G-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の825位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、825位塩基がCであるG-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子において825位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は825位塩基がTであるG-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子において825位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、G-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット。

以上では、(1)～(4)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(1)～(4)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(2)～(4)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

【0050】

以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(5) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-850位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、-850位塩基がCである腫瘍壊死因子 α 遺伝子において-850位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマー及び／又は-850位塩基がTである腫瘍壊死因子 α 遺伝子において-850位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、腫瘍壊死因子 α 遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(6) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-238位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、-238位塩基がGである腫瘍壊死因子 α 遺伝子において-238位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマー及び／又は-238位塩基がAである腫瘍壊死因子 α 遺伝子において-238位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、腫瘍壊死因子 α 遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(7) インスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、3494位塩基がGであるインスリン受容体サブストレート1遺伝子において3494位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は3494位塩基がAであるインスリン受容体サブストレート1遺伝子において3494位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、インスリン受容体サブストレート1遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット、及び

(8) グリコプロテインIb α 遺伝子の1018位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、1018位塩基がCであるグリコプロテインIb α 遺伝子において1018位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は1018位塩基がTであるグリコプロテインIb α 遺伝子において1018位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、グリコプロテインIb α 遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット。

以上では、(5)～(8)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(5)～(8)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(5)、(7)、及び(8)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

【0051】

以下の(1)～(4)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1)1648位塩基がAであるグリコプロテインIa遺伝子のアンチセンス鎖において1648位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、1648位塩基がGであるグリコプロテインIa遺伝子のアンチセンス鎖において1648位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第2核酸と、及びグリコプロテインIa遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されてグリコプロテインIa遺伝子の1648位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット、

(2)190位塩基がGであるケモカイン受容体2遺伝子のセンス鎖において190位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、190位塩基がAであるケモカイン受容体2遺伝子のセンス鎖において190位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第2核酸と、及びケモカイン受容体2遺伝子のアンチセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されてケモカイン受容体2遺伝子の190位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット、

(3)アポリポプロテインC-III遺伝子の1100位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された第1核酸及び第2核酸と、1100位がCであるアポリポプロテインC-III遺伝子を鋳型として前記第1核酸及び前記第2核酸を用いて増幅される核酸に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第3核酸と、及び1100位がTであるアポリポプロテインC-III遺伝子を鋳型として前記第1核酸及び前記第2核酸を用いて増幅される核酸に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第4核酸と、からなる核酸セット、

(4)825位塩基がCであるG-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子のアンチセンス鎖

において825位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、825位塩基がTであるG-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子のアンチセンス鎖において825位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第2核酸と、及びG-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されてG-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子の825位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット。

以上では、(1)～(4)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(1)～(4)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(2)～(4)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

【0052】

以下の(5)～(8)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(5)-850位塩基がCである腫瘍壊死因子 α 遺伝子のセンス鎖において-850位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、-850位塩基がTである腫瘍壊死因子 α 遺伝子のセンス鎖において-850位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第2核酸と、及び腫瘍壊死因子 α 遺伝子のアンチセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されて腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-850位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット、

(6)-238位塩基がGである腫瘍壊死因子 α 遺伝子のセンス鎖において-238位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、-238位塩基がAである腫瘍壊死因子 α 遺伝子のセンス鎖において-238位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の

標識物質で標識された第2核酸と、及び腫瘍壊死因子 α 遺伝子のアンチセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されて腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-238位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット、

(7) 3494位塩基がGであるインスリン受容体サブストレート1遺伝子のアンチセンス鎖において3494位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、3494位塩基がAであるインスリン受容体サブストレート1遺伝子のアンチセンス鎖において3494位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第2核酸と、及びインスリン受容体サブストレート1遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されてインスリン受容体サブストレート1遺伝子の3494位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット、及び

(8) 1018位塩基がCであるグリコプロテインIb α 遺伝子のアンチセンス鎖において1018位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、1018位塩基がTであるグリコプロテインIb α 遺伝子のアンチセンス鎖において1018位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第2核酸と、及びグリコプロテインIb α 遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第1核酸又は前記第2核酸とともに使用されてグリコプロテインIb α 遺伝子の1018位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅することが可能な第3核酸と、からなる核酸セット。

以上では、(5)～(8)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(5)～(8)の中から二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば(5)、(7)、及び(8)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

【0053】

以上の各キットにおいては、キットの使用方法に応じた一又は二以上の試薬（バッファー、反应用試薬、検出用試薬など）などを組み合わせてもよい。

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。

【0054】

【実施例】

<実施例1> 遺伝子多型の選択

PubMed[National Center for Biological Information (NCBI)], Online Mendelian inheritance in Men (NCBI), Single Nucleotide Polymorphism (NCBI)などの数種類の公的データベースを用いて、今までに報告された遺伝子の中から血管生物学、血小板・白血球生物学、凝固線溶系、脂質・糖・その他の代謝因子などの総合的側面から冠動脈硬化、冠動脈攣縮、高血圧、糖尿病、高脂血症などとの関連が推定される71遺伝子を抜粋した。さらにこれらの遺伝子に存在する多型の中でプロモーター領域やエクソンに存在するもの、あるいはスプライスドナー部位やアクセプター部位に位置し、遺伝子産物の機能変化との関連が予想されるものを中心に112多型を選択した（図1及び図2）。

【0055】

<実施例2> 遺伝子多型の決定

対象は1994年7月から2001年12月の間に参加15施設を受診（または入院）した日本人1940例（男性1107例、女性833例）である。高血圧例は1067例（男性574例、女性493例）で、収縮期血圧 ≥ 140 mmHg または拡張期血圧 ≥ 90 mmHg、あるいはその両方、であるか降圧薬を服用している症例である。冠動脈疾患、心臓弁疾患、先天性心血管疾患、または腎疾患・内分泌疾患など二次性高血圧を来す疾患を有する症例は除外した。対照は正常血圧（収縮期血圧 < 140 mmHg、拡張期血圧 < 90 mmHg）の873例（男性533例、女性340例）で、従来の冠動脈疾患危険因子、即ち喫煙（1日10本以上）、肥満（body mass index > 26 kg/m²）、糖尿病（空腹時血糖 > 126 mg/dLまたはヘモグロビンA1c $> 6.5\%$ 、あるいはその両方）、高脂血症（血清総コレステロール > 220 mg/dL）、高尿酸血症（男性では血清尿酸 > 7.7 mg/dL、女性では血清尿酸 > 5.5 mg/dL）の少なくとも一つを有するが冠動脈疾患を有しない症例である。これらの対照は安静時心電図が正常であり、運動

負荷試験でも心筋の虚血性変化は認められなかった。血圧はアメリカ心臓協会のガイドラインに従い、座位で測定した (Perloff D, Grim C, Flack J, Frohlich ED, Hill M, McDonald M, Morgenstern BZ. Human blood pressure determination by sphygmomanometry. *Circulation*. 1993;88:2640-2470.)。

【0056】

それぞれの対象から静脈血7 mLを50 mmol/L EDTA-2Naを含むチューブに採血し、ゲノムDNAをDNA抽出キット (Qiagen, Chatsworth, CA) を用いて抽出した。一塩基多型の遺伝子型の決定は蛍光・発光法によるアリルト異的プライマー・プローブ測定システム (東洋紡ジーンアナリシス、敦賀、日本) により行った (図3)。多型部位を含むDNA断片は5'末端にfluorescein isothiocyanate (FITC) またはTexas red (TxR) で標識した2種類のアリルト異的センス (またはアンチセンス) プライマーと5'末端をビオチンで標識したアンチセンス (またはセンス) プライマーを用いてpolymerase chain reaction (PCR) により増幅した。また別法として、多型部位を含むDNA断片は2種類のアリルト異的センス (またはアンチセンス) プライマーと5'末端をビオチンで標識したアンチセンス (またはセンス) プライマーを用いて、またはセンスプライマーと5'末端をビオチンで標識したアンチセンスプライマーを用いてPCRにより増幅した。反応溶液 (25 μ L) には20 ngのDNA、5 pmolの各プライマー、0.2 mmol/Lの各デオキシヌクレオシド三リン酸、1-4 mmol/Lの塩化マグネシウム、1 UのDNAポリメラーゼ (rTaq or KODplus; 東洋紡、大阪、日本) を含み、それぞれのDNAポリメラーゼ緩衝液を用いた。増幅プロトコールは初期変性が95℃で5分、35-45サイクルで変性が95℃で30秒、アニーリングが55-67.5℃で30秒、伸展が72℃で30秒、そして最終伸展が72℃で2分とした。

【0057】

蛍光法による遺伝子型の決定では、増幅したDNAを96穴プレートの各ウェルでストレプトアビジン結合磁気ビーズを含む溶液中で室温インキュベートした。このプレートを磁気スタンド上に置き、各ウェルから上清を採取し、0.01 M NaOHを含む96穴プレートの各ウェルに移した後、マイクロプレートリーダーによりFITCは励起・蛍光波長が485と538 nm、TxRは励起・蛍光波長が584と612 nmで蛍光

を測定した。また発光法による遺伝子型の決定では、増幅したDNAを0.3 M NaOHで変性させ、96穴プレートの各ウェルの底面に固定したいずれかのアリル特異的補足プローブと35-40% ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション緩衝液で37℃、30分間ハイブリダイゼーションを行った。ウェルを十分に洗浄した後、アルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジンを各ウェルに加え、プレートを37℃、15分間振騰した。ウェルを再度洗浄し、0.8 mM 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (monosodium salt)と0.4 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine saltを含む溶液を加えた後、450 nmでの吸光度を測定した。

【0058】

本方法による遺伝子型決定の精度を確認するために、50人のDNAサンプルを無作為に選びPCR-制限酵素断片長多型法またはPCR産物の直接塩基配列決定法を行った。いずれのサンプルにおいてもアリル特異的プライマー・プローブ測定システムにより決定された遺伝子型はPCR-制限酵素断片長多型法またはDNA塩基配列決定法によって決定されたものと同一であった。

【0059】

以下の関連解析における統計解析は次のように行った。臨床データは高血圧例と対照との間でunpaired Student's t test または Mann-Whitney U testを用いて比較した。定性的データはchi-square testで検定した。アリル頻度はgene counting methodにより推定し、Hardy-Weinberg平衡から逸脱しているかどうかはchi-square testによって検定した。本発明者らは危険因子を補正した多項ロジスティック回帰分析を行った。高血圧を従属因子とし、年齢、body mass index (BMI)、喫煙状況 (0 = 非喫煙, 1 = 喫煙)、代謝因子 (0 = 糖尿病・高コレステロール血症・高尿酸血症の経歴なし, 1 = 経歴あり)、各多型の遺伝子型を独立因子とした。それぞれの遺伝子型はdominant (優性)、recessive (劣性)、additive (付加) 遺伝モデルで解析し、P値、オッズ比、95%信頼区間を算出した。組み合わせ遺伝子型解析では、ロジスティック回帰分析のstepwise forward selection method によりそれぞれの遺伝子型についてのオッズ比を算出した。

【0060】

<実施例3> 高血圧に関連する多型の選択、及び高血圧リスク診断法の開発

本発明者らは先の報告において71候補遺伝子112多型と心筋梗塞との関連解析を男性451例（心筋梗塞219例、対照232例）と女性458例（心筋梗塞226例、対照232例）について行った（Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, et al. Prediction of risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. N Engl J Med. in press.）。この研究により男性で19個、女性で18個の一塩基多型が心筋梗塞発症と関連することを見出したが、それらの多型群の中には高血圧の候補遺伝子も含まれていた（図1、図2、図4を参照）。本実施例ではこれらの一塩基多型と高血圧との関連について1940例の大規模関連解析を行った。

【0061】

検討した全対象1940例（男性1107例、女性833例）の背景データを図5に示す。男性では、年齢、BMI、高尿酸血症の頻度、血清クレアチニン濃度および収縮期・拡張期血圧が対照に比較し高血圧例で有意に高く、喫煙の頻度が対照に比較し高血圧例で有意に低かった。女性では、年齢、BMI、高コレステロール血症と高尿酸血症の頻度および収縮期・拡張期血圧が対照に比較し高血圧例で有意に高かった。

【0062】

男性19多型、女性18多型と高血圧との関連解析において、年齢、BMI、および喫煙、糖尿病、高コレステロール血症、高尿酸血症の頻度を補正した多項ロジスティック回帰分析により男女それぞれ4個の多型が高血圧罹患と有意な関連を示した(dominant または recessive 遺伝モデルのいずれかが $P<0.05$) (図6)。これらの多型の遺伝子型分布を（図7）に示す。

【0063】

本発明者らは多項ロジスティック回帰分析のstepwise forward selection method を行った(図8)。本法では、図6に示したそれぞれの多型の高血圧との関連におけるP値（より低いP値）に基づいてdominant（優性）またはrecessive（劣性）遺伝モデルを採用した。これらの遺伝子の染色体上の遺伝子座を（図8）に示す。

【0064】

Tumor necrosis factor- α 遺伝子の-850C→Tと-238G→A多型は連鎖不平衡になかった[pairwise linkage disequilibrium coefficient, D' (D/D_{\max}), of -0.310, standardized linkage disequilibrium coefficient, r , of -0.020; $P = 0.613$, chi-square test]. Stepwise forward selection methodにより算出した組み合わせ遺伝子型による高血圧罹患のオッズ比を、男性は図9と図11(A)に、女性は図10と図11(B)に示す。男性では4個の多型の組み合わせ遺伝子型(GPIa(1648A→G)多型、CCR2(190G→A)多型、ApoC-III(1100C→T)多型、GP β 3(25C→T)多型)により、最大のオッズ比が5.34となった(図9、図11(A))。女性では4個の多型の組み合わせ遺伝子型(TNF α (-850C→T)多型、TNF α (-238G→A)多型、IRS-1(3494G→A)多型、GPIb α (1018C→T)多型)により、最大のオッズ比が46.86となった(図10、図11(B))。

【0065】

以上のように、多項ロジスティック回帰分析により男性で4個、女性で4個の一塩基多型が高血圧と関連した。即ち、本発明者らは男性で19個、女性で18個の一塩基多型と高血圧との関連について1940例の大規模関連解析を行い、男女それぞれに高血圧罹患と関連する多型を4個ずつ同定した。さらに、多項ロジスティック回帰分析のstepwise forward selection methodにより男性では最大オッズ比5.34、女性では最大オッズ比46.86を呈する組み合わせ遺伝子型を用いた高血圧の遺伝子リスク診断法を開発した。

【0066】

血圧は、血管の構造や緊張性および体液の量と組成を調節する多様な生物システムの統合のみならず、これらのシステムの継続的に変化する生理的必要性に対する適応によって調節される(Lalouel J-M, Rohrwasser A. Development of genetic hypotheses in essential hypertension. J Hum Genet. 2001;46:299-306.)。本発明者らは血管生物学、血小板・白血球生物学、線溶系、脂質・糖・その他の代謝因子などの包括的視点に基づいて男性19個、女性18個の一塩基多型と高血圧との関連について検討した。実際、高血圧と関連した遺伝子群はその病態において多彩な役割を有していた。すなわち、血管生物学(G-protein β 3 subunit)、血管の炎症(tumor necrosis factor- α)、単球・リンパ球生物学(chem

okine receptor 2)、血小板機能 (glycoprotein Ia and glycoprotein Ib α)、脂質代謝 (apolipoproteins C-III)、インスリン・グルコース代謝 (insulin receptor substrate-1) などである。本発明者らの開発した遺伝子リスク診断システムは高血圧罹患の最大オッズ比が男性で5.34、女性で46.86を呈し、とりわけ女性においては、今までに報告された大規模関連解析の中で最大のオッズ比を示した。高血圧と関連した8個の多型の中で、腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-850C→Tと-238G→A多型が女性の高血圧リスクとして最大のオッズ比を示した。腫瘍壊死因子 α 遺伝子座はフランス系カナダ人において肥満に伴う高血圧と関連することが報告された (Pausova Z, Deslauriers B, Gaudet D, Tremblay J, Kotchen TA, Larochelle P, Cowley AW, Hamet P. Role of tumor necrosis factor- α gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in French Canadians. Hypertension. 2000;36:14-19.)。また腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-308A→G多型は統計的有意差はないが本態性高血圧と関連する傾向が認められた (Frossard PM, Gupta A, Pravica V, Perry C, Hutchinson IV, Lukic ML. A study of five human cytokine genes in human essential hypertension. Mol Immunol. 2002;38:969-976.)。カナダ原住民においては、血清腫瘍壊死因子 α 濃度は収縮期血圧とインスリン抵抗性に関連することが報告された (Zinman B, Hanley AJG, Harris SB, Kwan J, Fantus IG. Circulating tumor necrosis factor- α concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 1999;84:272-278.)。腫瘍壊死因子 α はさらに強力な血管収縮物質であるエンドセリン-1の産生を促進し (Kahaleh MB, Fan PS. Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. Clin Exp Rheumatol. 1997;15:163-167.)、血清中の両物質の濃度は正の相関を有することが肥満例で示された (Winkler G, Lakatos P, Salmon F, Nagy Z, Speer G, Kovacs M, Harmos G, Dworak O, Cseh K. Elevated serum TNF- α level as a link between endothelial dysfunction and insulin resistance in normotensive obese patients. Diabetes Med. 1999;16:207-211.)。これらの知見および本発明者らの上記結果から、腫瘍壊死因子 α 遺伝子は高血圧感受性遺伝子座の候補である。他の6個の多型の中で、G-タンパク質 $\beta 3$ s

βユニット遺伝子の825C→T多型は高血圧と関連することが報告されている (Siffert W, Roszkop D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann H-E, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein β3 subunit variant with hypertension. Nat Genet. 1998;18:45-48.)。またアポリポプロテインC-III遺伝子多型は血圧に関連することが報告されている (Tas S, Abdella NA. Blood pressure, coronary artery disease, and glycaemic control in type 2 diabetes mellitus: relation to apolipoprotein-CIII gene polymorphism. Lancet. 1994;343:1994-1995.)。ケモカイン受容体2遺伝子とインスリン受容体サブストレート1遺伝子は高血圧の病態に関与することが示されている (Bush E, Maeda N, Kuziel WA, Dawson TC, Wilcox JN, DeLeon H, Taylor WR. CC chemokine receptor 2 is required for macrophage infiltration and vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension. Hypertension. 2000;36:360-363.)、Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, Shionoiri F, Yahagi N, Kadowaki T, Tamemoto H, Ishibashi S, Yazaki Y, Makuuchi M. Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. J Clin Invest. 1998;101:1784-1788.)。さらに、血小板の活性化は本態性高血圧の病態において役割を有することが報告されている (Andrioli G, Ortolani R, Fontana L, Gaino S, Bellavite P, Lechi C, Minuz P, Manzato F, Tridente G, Lechi A. Study of platelet adhesion in patients with uncomplicated hypertension. J Hypertens. 1996;14:1215-1221.)、Dockrell ME, Walker BR, Noon JP, Watt GC, Williams BC, Webb DJ. Platelet aggregation in young men contrasting predisposition to high blood pressure. Am J Hypertens. 1999;12:115-119.)、Bereczki C, Tur S, Nemeth I, Sallai E, Torday C, Nagy E, Haszon I, Papp F. The roles of platelet function, thromboxane, blood lipids, and nitric oxide in hypertension of children and adolescents. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2000;62:293-297.)。グリコプロテインIaとグリコプロテインIbα遺伝子の多型は冠動脈疾患と関連することが報告されているが (Kroll H, Gardemann A, Fechter A, Haberbo

sch W, Santoso S. The impact of the glycoprotein Ia collagen receptor subunit A1648G gene polymorphism on coronary artery disease and acute myocardial infarction. Thromb Haemost. 2000;83:392-396.、Murata M, Matsubara Y, Kawano K, et al. Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation. Circulation. 1997;96:3281-6.)、これらの多型と高血圧との関連は報告されていない。

【0067】

本実施例で検討した多型のいくつかは、その近傍に存在する高血圧発症と真に関連する遺伝子の多型と連鎖不平衡にある可能性がある。しかしながら、著者らの結果は、グリコプロテインIa、ケモカイン受容体2遺伝子、アポリポプロテインC-III遺伝子、G-タンパク質 β 3サブユニット遺伝子が日本人男性において、腫瘍壊死因子 α 遺伝子、インスリン受容体サブストレート1遺伝子、グリコプロテインIb α 遺伝子が日本人女性において高血圧感受性遺伝子座であることを示した。さらに、これらの遺伝子多型の組み合わせ遺伝子型は高血圧の遺伝的リスク診断に有用であることも示した。本発明者らの遺伝子診断法は高血圧の一次予防のみならず高血圧が原因で生じる心血管疾患、脳卒中、腎疾患などの予防にも貢献できると考えられる。

【0068】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

【0069】

【発明の効果】

本発明によれば高血圧に関連する遺伝子多型が解析され、そして核酸試料の遺伝子型が検出される。この遺伝子型の検出によって得られる多型情報を用いることにより、高精度で予知確率の高い高血圧のリスク診断を行うことができる。したがって、本発明は高血圧の発症リスクを事前に知る有効な手段となり、高血圧の一次予防はもちろんのこと高血圧が原因で生じる心血管疾患、脳卒中、腎疾患などの予防への貢献が期待できる。また、本発明によれば高血圧の診断に有用な

補助的情報が得られ、より適切な治療を可能とし予後の改善などを図ることができる。更に本発明は高血圧の発症メカニズムを解明する上での有効な情報を提供することから、高血圧の予防法の確立にとって極めて重要な一手段ともなる。

【0070】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE
GIFU INTERNATIONAL INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY

<120> Method for diagnosing a risk of hypertension

<130> C02007

<140>

<141>

<160> 36

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5373

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaattcctgc aaaccagcg caactacggt ccccgggtca gaccaggat ggggccagaa 60
cggacagggg ccgcgccgct gccgctgctg ctggtgttag cgctcagtca aggcatTTTA 120
aattgttgtt tggcctacaa tgttggtctc ccagaagcaa aaatattttc cggtccttca 180
agtgaacagt ttgggtatgc agtgcagcag ttataaatc caaaaggcaa ctggttactg 240
gttggttcac cctggagtgg ctttcctgag aaccgaatgg gagatgtgta taaatgtcct 300
gttgacctat ccaactgccac atgtgaaaaa ctaaatttgc aaacttcaac aagcattcca 360
aatgttactg agatgaaaac caacatgagc ctcggcttga tcctcaccag gaacatggga 420
actggagggtt ttctcacatg tggctcctctg tgggcacagc aatgtgggaa tcagtattac 480
acaacgggtg tgtgttctga catcagtcct gattttcagc tctcagccag cttctcacct 540

gcaactcagc cctgcccttc cctcatagat gttgtggttg tgttgatga atcaaatagt 600
atttatacctt gggatgcagt aaagaatttt ttggaaaaat ttgtacaagg ccttgatata 660
ggccccacaa agacacaggt ggggttaatt cagtatgcca ataatccaag agttgtgttt 720
aacttgaaca catataaaac caaagaagaa atgattgtag caacatccca gacatcccaa 780
tatggtgggg acctcacaaa cacattcgga gcaattcaat atgcaagaaa atatgcctat 840
tcagcagctt ctggtgggcg acgaagtgc acgaaagtaa tggtagttgt aactgacggg 900
gaatcacatg atggttcaat gttgaaagct gtgattgatc aatgcaacca tgacaatata 960
ctgagggttg gcatagcagt tcttgggtac ttaaacagaa acgcccttga tactaaaaat 1020
ttaataaaag aaataaaagc gatcgctagt attccaacag aaagatactt tttcaatgtg 1080
tctgatgaag cagctctact agaaaaggct gggacattag gagaacaaat tttcagcatt 1140
gaaggctactg ttcaaggagg agacaacttt cagatggaaa tgtcacaagt gggattcagt 1200
gcagattact cttctcaaaa tgatattctg atgctgggtg cagtgggagc ttttggctgg 1260
agtgggacca ttgtccagaa gacatctcat ggccatttga tctttcctaa acaagccttt 1320
gaccaaattc tgcaggacag aaatcacagt tcatatttag gttactctgt ggctgcaatt 1380
tctactggag aaagcactca ctttgttgct ggtgctcctc gggcaaatta taccggccag 1440
atagtgtat atagtgtgaa tgagaatggc aatatcacgg ttattcaggc tcaccgaggt 1500
gaccagattg gctcctatit ttgtagtgtg ctgtgttcag ttgatgtgga taaagacacc 1560
attacagacg tgctcttggg aggtgcacca atgtacatga gtgacctaaa gaaagaggaa 1620
ggaagagtct acctgtttac tatcaaaaag ggcattttgg gtcagacca atttcttgaa 1680
ggccccgagg gcattgaaaa cactcgattt ggttcagcaa ttgcagctct ttcagacatc 1740
aacatggatg gctttaatga tgtgattgtt ggttcaccac tagaaaatca gaattctgga 1800
gctgtataca tttacaatgg tcatcagggc actatccgca caaagtattc ccagaaaatc 1860
ttgggatccg atggagcctt taggagccat ctccagtact ttgggagggtc cttggatggc 1920
tatggagatt taaatgggga ttccatcacc gatgtgtcta ttggtgcctt tggacaagtg 1980
gttcaactct ggtcaciaag tattgtgat gtagctatag aagcttcatt cacaccagaa 2040
aaaatcactt tggtaacaa gaatgctcag ataattctca aactctgctt cagtgcaaag 2100
ttcagacctt ctaagcaaaa caatcaagtg gccattgtat ataacatcac acttgatgca 2160
gatggatttt catccagagt aacctccagg gggttattta aagaaaacaa tgaaaggtgc 2220
ctgcagaaga atatggtagt aatcaagca cagagttgcc ccgagcacat catttatata 2280

caggagccct ctgatgttgt caactctttg gatttgcgtg tggacatcag tctggaaaac 2340
cctggcacta gccctgccct tgaagcctat tctgagactg ccaaggtctt cagtattcct 2400
ttccacaaag actgtggtga ggatggactt tgcatttctg atctagtcct agatgtccga 2460
caaataccag ctgctcaaga acaacccttt attgtcagca accaaaacaa aagggttaaca 2520
ttttcagtaa cactgaaaaa taaaaggga agtgcataca aacttggaat tgttgttgat 2580
ttttcagaaa acttgttttt tgcattcattc tccctaccgg ttgatgggac agaagtaaca 2640
tgccaggtgg ctgcatctca gaagtctgtt gcctgcgatg taggctaccc tgctttaaag 2700
agagaacaac aggtgacttt tactattaac ttgacttca atcttcaaaa ctttcagaat 2760
caggcgtctc tcagtttcca agccttaagt gaaagccaag aagaaaacaa ggctgataat 2820
ttggtcaacc tcaaaattcc tctcctgtat gatgctgaaa ttcacttaac aagatctacc 2880
aacataaatt tttatgaaat ctcttcggat gggaatgttc cttcaatcgt gcacagtttt 2940
gaagatgttg gtccaaaatt catcttctcc ctgaaggtaa caacaggaag tgttccagta 3000
agcatggcaa ctgtaatcat ccacatccct cagtatacca aagaaaagaa cccactgatg 3060
tacctaactg gggtgcaaac agacaaggct ggtgacatca gttgtaatgc agatatcaat 3120
ccactgaaaa taggacaaac atcttcttct gtatctttca aaagtgaaaa tttcaggcac 3180
accaaagaat tgaactgcag aactgcttcc tgtagtaatg ttacctgctg gttgaaagac 3240
gttcacatga aaggagaata ctttgttaat gtgactacca gaatttgga cgggactttc 3300
gcatcatcaa cgttccagac agtacagcta acggcagctg cagaaatcaa cacctataac 3360
cctgagatat atgtgattga agataacact gttacgattc ccctgatgat aatgaaacct 3420
gatgagaaag ccgaagtacc aacaggagtt ataataggaa gtataattgc tggaatcctt 3480
ttgctgttag ctctggttgc aattttatgg aagctcggct tcttcaaaag aaaatatgaa 3540
aagatgacca aaaatccaga tgagattgat gagaccacag agctcagtag ctgaaccagc 3600
agacctacct gcagtgggaa ccggcagcat cccagccagg gtttgctgtt tgcgtgcatg 3660
gatttctttt taaatcccat atttttttta tcatgtcgta ggtaactaa cctggatattt 3720
taagagaaaa ctgcaggtca gtttggtatga agaaattgtg ggggggtgggg gaggtgcggg 3780
gggcaggtag ggaaataata gggaaaatac ctattttata tgatggggga aaaaaagtaa 3840
tctttaaact ggctggccca gagtttacat tctaatttgc attgtgtcag aaacatgaaa 3900
tgcttccaag catgacaact tttaaagaaa aatatgatac tctcagattt taagggggaa 3960
aactgttctc tttaaaatat ttgtctttta acagcaacta cagaagtgga agtgcttgat 4020

atgtaagtac ttccacttgt gtatatatta atgaatattg atgttaacaa gaggggaaaa 4080
caaaacacag gttttttcaa tttatgctgc tcatccaaag ttgccacaga tgatacttcc 4140
aagtgataat tttatattata aactaggtaa aatttggtgt tggttccttt tataccacgg 4200
ctgccccttc cacaccccat cttgctctaa tgatcaaaac atgcttgaat aactgagctt 4260
agagtatacc tcctatatgt ccatttaagt taggagaggg ggcgatatag agactaaggc 4320
acaaaatfff gtttaaaact cagaatataa catttatgta aaatcccatc tgctagaagc 4380
ccatcctgtg ccagaggaag gaaaaggagg aaatttcctt tctcttttag gaggcacaac 4440
agttctcttc taggatttgt ttggctgact ggcagtaacc tagtgaattt ttgaaagatg 4500
agtaatttct ttggcaacct tcctcctccc ttactgaacc actctcccac ctcctgggtg 4560
taccattatt atagaagccc tctacagcct gactttctct ccagcgggtcc aaagttatcc 4620
cctcctttac ccctcatcca aagttcccac tccttcagga cagctgctgt gcattagata 4680
ttagggggga aagtcactctg tttatattac acacttgcat gaattactgt atataaactc 4740
cttaacttca gggagctatt ttcatattag gctaaacaag taagaaaaat aagctagagt 4800
gaatttctaa atgttggaat gttatgggat gtaaacaatg taaagtaaaa cactctcagg 4860
atttcaccag aagttacaga tgaggcactg gaaaccacca ccaaattage aggtgcacct 4920
tctgtggctg tcttgtttct gaagtacttt ttcttccaca agagtgaatt tgacctaggc 4980
aagtttggtc aaaaggtaga tcctgagatg atttggtcag attgggataa ggcccagcaa 5040
tctgcatttt aacaagcacc ccagtcacta ggatgcagat ggaccacact ttgagaaaca 5100
ccaccatttt ctactttttg caccttattt tctctgttcc tgagcccca cattctctag 5160
gagaaactta gattaaaatt cacagacact acatatctaa agctttgaca agtccttgac 5220
ctctataaac ttcagagtcc tcattataaa atgggaagac tgagctggag ttcagcagt 5280
atgcttttta gttttaaaag tctatgatct gatctggact tcctataata caaacacaca 5340
atcctccaag aatttgactt ggaaaaggaa ttc 5373

<210> 2

<211> 50000

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

aagcttcagt atgcaaattt tcaatgacat gtgcctgtgg attctgaaaa ttcacagatc 60
tgtctatcct tagctgagac tgaaggcatc tacttcccaa tgaccaaadc ctggtgctgt 120
ggcgacactg agcaggaact ccattagaat atcaatatca ctctgcagac attccatgat 180
gtaagctatg ttttctcttg ttgcaattac acttaattta ccaccagctg cttcaatgtc 240
atgggctatc ttgaaaaatg aagctccttt cgtagtcaaa ctggatgcaa gacacagcaa 300
atgagaagtt actaaattgt tggagtcctc atagctactg cctgctttta tgaacaaacc 360
aattcttgat gcagggcata gttttccaaa ggagaaatca taaaaccatt tggaaatttg 420
atgatctcaa ggtcctgatg atgtggagcc actcctatgg gggtagctgt ggctttaact 480
ttgggggcaa ctttgaggga ataaagtctc aaaaagaggg aataaagtct caagattgtt 540
cgtgacccat agtaacttct ggcttaaagg accattcggc aagtttttaa atgtattttc 600
tataatttcc atgtagttct ttatatattc tatttcttat ttaaaacctc tattttagct 660
cgtttccttt gacactgctc tggcagggaagg ggggtggca ctgcctcatt actgccaggt 720
aggggtagaa gtccattatc cacttgggtc ccattgatac ccaaagtggg gagaggctcc 780
tgttactgct ggtgagggtg ggagtcctcc cactaagttt ctgctaatac tgccttggtg 840
gcttgctact attcccatga agcctccact gatactacat tacttttggg tgggtggcaa 900
tgtcctgcct ctccactagc cctcctgctc taaaacaacc cgagtaggga gtgggaagga 960
agctttgtta ctggtaggtg ggagctgaag tccagacttg ccacattgtc ccactgatgc 1020
tacagggagg aggaagcggg ccacattact gcctgatagg gatgaaagcc ccagctccct 1080
acctggcctt cgctgatacc agcctgctac aggagtgaag agagatttga aggcctcaat 1140
atagcctgtc gaggggtggaa gtcttgctcc caatgggcct ttagcagcat ggggtgggtgt 1200
ggggccatag ctgtctctgt actgcttggc tagagtggag tatttgaggt ccaaagttt 1260
tctgtctttc tagccctttg gttagaaaga gcagactttt gttggaagta ttttttgtg 1320
ttacctgtt gtatttccag gttcctagct tctccagcac agtctgggat gtgtgagaca 1380
cagagaaaat ccagtgatgt tactaccgta tggtttcttg ggtcccaacg tctctagcta 1440
atctgtcca ctttttgag ttttcttatt tgttttagat cagggtattt gtcattttt 1500
ataggagaaa tatggaaaaa tacttctact ctatcttctt ggaagttcct gtttattttt 1560
tatgtccttt tctctggct agaccgtaag agacttacga acaaacact tacacattct 1620
actaaactca atgtccaaag tttgtgaact tcttgaatat tgcttgttca tttccacccc 1680
cagtcactga ctgaatctcc ctgctgtctg tctacaatgc caatgagctt ctggttaact 1740

tcttctcatg catgcttagg caacaacttc ccagttttac tacacttgcc catccctagt 1800
tttgttgttg cttaatccct tggccttagtg ccaccatact cctccagcag agcaaccaat 1860
tcttacatta taggacagca catatccact aaaaacagtt catgccacac caaccacatt 1920
tccctttgtc aacaaaatta cttgatagat aattccagga atgcctgatg aagctgattg 1980
acaacaagat atttggcaga ctctctgctg cctatacata ccttagcatg tggaactcaa 2040
gtaatgagag gtccatttaa ttggattgaa ttgggctgga taggattgga ttgaatcctg 2100
tgggatggct aggctaaatt agaaatgaag actagtittaa cagcagtatc caaggatagt 2160
tgactaatga gttaatttta ctctcaaaga cagtctttag tagtaagctg taatgcatta 2220
tatcaaacta ttttccagtc aatgatttat aagttacttg aataaggatg cttaaagatgt 2280
gccttattga aatggcaatt agcacaaagt tgggaatgaa atctaattag ttaaataaca 2340
gaatcacata aaaaaggact tgaataaatg tagcatccta ccatgttcct ggatagaaag 2400
actgctatcg taaagatatt cattctctc aggttaaatt ataaactcaa tgcaattcaa 2460
caggatttta aaaaactaga caaagtgatt ccaagtttac gfggaaaata aaatgtgagg 2520
gaccaaaca tatttgaaaa agaaagagaa taaaatctca tccttccaga taccacaatg 2580
tattataaag caatagtaat taacatgagg gcagaaatga gcaagcaagt gaacaaaata 2640
agacagatag tcacaggaaa ctcatatatt tatagggtgct ttgcgtataa tgaagatggg 2700
ccttcaaatc agttgggaaa agatgggtta ttcaataaat ggtgttgggt aaaattgggt 2760
atacattggg gagaaataaa gtgaaactcc tactttgtat catatgcaa aaatagattc 2820
cagacagatg aaatatTTaa atgtaaaaa taaaattcta aaactactag aaaaaaaga 2880
agaatatTTt tattcctttg aaatagaaaa ggtcttacta agcaaaacac agaagtaata 2940
aatgaataaa tgaagacaaa tatgataaaa ataagttaaa aatataagca atctttcttt 3000
gttttttttt caccttccct agaaaaaaat atataggcaa cttgttaagc aaggtagatt 3060
acaagaaaat atttacaaca tttgacaggc cacagattat tatccagcct catctgataa 3120
gaaaacttca acataaagat atctgttttt tttcttataa ggttcctcaa agtgagccaa 3180
tcacttctta agctgaacaa aaaacaaaac agaagtgatc tttccaata atgaaaacaa 3240
acattgacag agcagctgta ggatcccttc aggcaaatta tgaaaagggtg ccctttctca 3300
gaaaccacag ttaccattca gctttgtgac cagaggtttg actgtaccct agtccttact 3360
agcaacccaa ccacataacc aacttcaaag gtcctgaatg actgtgttgt acttaatggc 3420
agatgatcta tctccattt ttgtcctaag gattttccaa gataatatat ttctgcattt 3480

gttttgcttt tacttcactc caaattgaaa tctatttgtg ggataagact aaagaaatgc 3540
ttataggaaa attgatagca ccaaattcct atcttaaaaa atgaaaaagg tttcaaatca 3600
atgacctcag cttttacttt aagaaaatag aaaaagcagg ataagctaaa gccaaagtaa 3660
acagaagaaa ggaaattata aagataagag cagaaatcaa tgaatagaaa acaaaagaaa 3720
aaaatcaaac caaacagctg attctttaag cagatctata aaattgataa aactctagcc 3780
agattgatca agtaaaaaag agagaagaca caaattacca gtattaagaa tgagagaggc 3840
aatatcacta cagatcctac agatataaaa agtataaggg catactttga ataattttat 3900
gactataaat taggcaactt agataaaaca aatttcttga aagacacaaa caaccaaagc 3960
tcacctaaaa tactcacaaa ttgaatagtc ttatagctat tacaaaattg aggccaggcg 4020
cagtggctca agcctttaat cccagcactt tgggagggct aggaaggcgg atcacgaggt 4080
caggagtittg agaccagcct gactaacatg gtgaaaccct gtcttacta aaagtacaaa 4140
aattagccag gccttggtggt gcgtgcctgt aatcccatct actcaggaga ctgaggcagg 4200
agaattgctt gaacctggga ggcaaagttg tggtaggccc agatcgcgcc actgcacttc 4260
agcctgggca acagaacaag actccgtctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaattgaaat 4320
tatagttaaa agtcttccca caaagcaaac tctagacca gatggcttca atggtaaatt 4380
ctactggaca atcaaacagg aaacagtaat aattctccac aatgtctttc ataaaattga 4440
tgcggaggag atactctcca actcattcta tgaaactagc attaccctga taccaaaatc 4500
atacagagac agtgtaggaa aacaacagat cagtatcctt catgaacata aatgaagtac 4560
aatgcagtct tatgcataaa tcagagcttc attgttctac agataaggta atgtaggatt 4620
gttggttgcc cctccaggtc tgttaaattc acctccttcc ccagagagca tccttcttaa 4680
ggacagggag cctcaatatg tcagtcctca cagcacctcc ctcagtcttc agcacttacc 4740
agctcatcac cacaaccgat accacattgg ataatttcat gaattacttt agagcaaatg 4800
caagagaaaa aatggatttt tatataggag aagaaggagg aaattcttgt ggatttggtg 4860
cagaataggg ccaagggaatg attacagatg taaaaagaaa agtgtgtgaa atagtatcct 4920
tagtgctcac aaatacaatg atttcattgt ttttaaaaat aaaaaatgac aaatgtctaa 4980
tgcttggtgg taatgcttta ttgaatgtgt gttatacact ggcttctcat tcctgaagtt 5040
agaaataata ccttctcttt ttcatttggt tatgtttgct gaaacaaatc aaaggctgag 5100
attgaaacac atgctacttc aggtggatga ctttactact aagctcatca caacagcact 5160
tacagctgaa gacccagag tcctacctaa cttttgtcac aaccagatt ttggccatgt 5220

agttctgggc cttaccatta aagcagacag aagtcagagg aatgactcct ttccacttga 5280
agtgaagctgc aggcttctag gaaaggcaag atgcacattt ccttcctgtg gagcataaag 5340
ccttttgaat tcaggactta ggacccatat ggatttgaaa tattatgaca ttggagctgg 5400
agtggttggg gacaacacca gtagtgittat aggccatgga atgtcaaaag aacatggaac 5460
cctgttaaaa tcattaaaca tcaaaactct cccctcctct ggtgatatgg tttggctgtg 5520
tccccatcca aatctcatct tgaactccca tgtgttggg gaggcacca gtgggaggta 5580
attgaatcat gggggcaggt ctttcccatg ctgttttcac gatactgaat aagtctcaca 5640
agatctgatg gttttataaa ggggagcttc cctgcacaag ctctcttctc ttgtctgcca 5700
ccatgtgaga catgcctttc acctccgcc atgattgtga ggcctcccca accatgtgga 5760
actttaagt tcattaaacc tcttcctttt gtaaattgct cagtctcaa tatgtcttta 5820
tcagcaacgt gaaaacagac tatctgattt tctgtgggat gtggattatg accatggaca 5880
gagcataact gggacagagc tggaaaaaat attaattagg tgcttaaaaa tatttgtag 5940
aactatcttc atgaatgaga atcaatcctg ttccatggt gattcaccag gcatcaattc 6000
caagcatcca tgaatcagaa aagtcctatc ttctcttagt tatcatccag gactccaagg 6060
aaccataatt agccaacctg ttcacatttc cttttcattc actagcctcg aagtttccag 6120
gggacaggga ctctgtccta ttcatttctg taaccttacc acctgacca gaatagctgt 6180
tccctgaaga tttgggtgat tataaatgtg gatgtcttat ttctttgaaa gtgtgagctt 6240
caggtactga tcacgttatt ccaattatca atttagtata tttcttcacc attaaactgt 6300
gaaattcttg agggaagaac ctatgactga tttatctctg taaactcatg ccaccagtat 6360
tcaaaatcac acctagcaca tagtaaacac tcaatgtttg ttgaatgact gaaggaatgg 6420
atgaaaatga acctccttgc ttctgaccag tggatgagtt gcttggccgt gttcctacag 6480
cctagagctc atcccctaaa gcatctgaag ttaccatta gtgcaatggt tcttgaacgc 6540
tggtgttgat cagaatcatc tggatgccca gggtctctga aataagatag ggtctaggca 6600
tttgtatfff taccaaggag gtgtgatgga gtcagatgca agaaggctag ttgaagaaac 6660
cacatgagag tttagtgtag tgtattagaa gactggtttg gctctgtcgc tagtggctac 6720
atcatcttgc tcaagtcatg ccagtctcag gacctattc agtctcttca gctgtaatat 6780
gggtgggttg caccacataa ccagaaagat ccttccagc tctaccact tacaacatgg 6840
tcaaatitgg tctgattttt taaatcgtag tacaatatat atgacataaa attcaccatt 6900
ttagccactt taaatgtaca attctgtagc attaaactaca ttcacattgt tgtgcaacca 6960

tcactaccgt ctacttccag aactcttcat ctigcaaaac tgaacctctg ttgtcattag 7020
tcactaacta ttcctctccc cccctccttc taggccttg caatcacat tctactttct 7080
gtcgctatga atttgactac tctaggtaac ttatataagt ggaatcacag catttgccct 7140
attatgactg gtttagttga cttagcaca cctcctaagg ctcaaccaca ttttagcatg 7200
tgtcagaatt ttctttgttt ttaaggctga ataataattct gttgtatctg taaataacat 7260
ctttattcat ttgtccatca acagactgtt gagttcctcc catcttttga ctattgtgaa 7320
aatgctgct atgaacctga gtgtacagac atctggttga gtactgcttt caattcattg 7380
tttatatgga tcatatggta attttatgtt taattttttt ggaactgcta cattgttttc 7440
cacagtgtac atcattttac atttccatca gcaatgcaca aaggttccaa tttctccaca 7500
ttcttaccaa catTTTTTat tttctgtttc ttatttattt gtttatttat tctgagacag 7560
agtctcactc tgtcacctag gctggagtgc agcagggtga tctcagctca ctgcaacctc 7620
tgccctccat gttcaagtga ttctcctccc tcagcctccc aagtaaagg aattacagg 7680
gcccaccacc acgcccagg 7740
ggttggtcagg ctggtcttga actcctgacc tcaagtgate caccgcctc agcctccaa 7800
agtgtggtga ttacaggat gaaccactgc accaggcca ttttttgctt tttagataat 7860
agtcatccta gtgggtatga agtggtattt cattgtggtt ttgatttata tttcccta 7920
gatcagtgat attgagcatc tticaagtgc ttattggcca tttcttctt tggagaaatg 7980
tctatgcaag tcctttgctc atttttta 8040
gaaagtgtc tttatactc ttgtatacta atcccttacc agatatgatt tataaatatt 8100
ttcttctttt ccatggattg ccctttttac tctgttgata gtgttctttg atacaaaata 8160
atttttaatt tgaatgaagc ccaattaatc tatttttgtt tcttttgtt cctgtgcttt 8220
tggtgtccta tccaagaaac tgttgccaaa tccaatgtca taaagctttt tcccatgctt 8280
ccttctaaga gttttgtagt tacagctctt gtatttaggt atttgactat tttgagttaa 8340
tttttgtaca tcgtataaaa taagaatcca atttttattt tattttactt tttgtatgtg 8400
gatatccaat ttccccacca ccattcattg aaaagactgt ccttttcta tcgaatggtc 8460
ttggcacct tgtaaaacat aatttgacca tatatgtgag ggtttatttc tgggctctct 8520
attctattct attctattct attctattct attctattct attctattct attctattct 8580
attggtccct atgtctttct ttattctagt accaccattt tgctcatcat aactttgtag 8640
taagttttga agtcaggaat cgtaagacct ccagctttgt tcattttcaa gggtgttttg 8700

attattcaag gtcctt gat agtccat atg aatttcagga tggatttttc tattttctgca 8760
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaatcatt gaaattttta aacagattgc attaaatctg 8820
tagattgttt tgggtagtat tgacatttaa caacattaaa tcttccaatc aatgaactag 8880
gctattttta tttatttttt ctgtttcttt gagctacttt tgtagttttc agtgtataag 8940
tttttgctac ctggttaggt atacttctaa gtatttttcta ctttttgatg ctattgcaca 9000
ttgaatcggt ttcttaattt ggtggtagcg gggattgtgc attgttagta cataaaaatg 9060
caactcatth tttgtgtgtt gattttgtat cctgcagctt taacaaattc atgttagttc 9120
taacagactt attctatgaa tcattaggggt tttctacata aaagatcatg tcacctacaa 9180
acagagataa ttttactcca ccccttcccg ttgcaatgcc ttttatgtct ttttcttgcc 9240
taattgttct ggctaagact tccactacca tgttgaatag aagtggtgaa agtagacatc 9300
cttgtcttgt tccaatctta gagccaaagc tttcagttct tcacggcctg aaagactttg 9360
taatattgtt tcaaggttta agaacttcag aagttttcta agcaagagac cattttatta 9420
acttagttgg cagcaattct gagagattag aatgaaaaga tagaggataa gaagtatctg 9480
gcaggtataa tatattgagt gtgctgaata tacttttagt tttgtatagg tgttaaaaaa 9540
tggcaaagga ggccgggcgt ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt gggaggccga 9600
ggcgggcaga tcatgaggtc aggagatcga gaccatcctg gctaaaacag tgaaacccta 9660
tctctactaa aaatacaaaa aactcgctgg gcatgggtgt ggacacctgt agtcccagct 9720
actcgggagg ctgaggcagg agaattgtgt gaacctggaa ggtggagctt gcagttagcc 9780
gagatcacgc cactgcactc cagcctgggc gacagagaga gactccgtct caaaagaaaa 9840
aaaaaatggc aaaggaaaga atgaaaaata aagcaaggct ccagaagagg ccaaaaatct 9900
taatcaaat tgactgaaca ttacggaatg aaatggtttt tcctttactc caattaacga 9960
cttcacaaga agattccatc ctcttttata agattaaccc aaaaccagca cttaaaacca 10020
gaagccttga aaggatggag tttggggacc ctctcatgt ctattcccag aaggggggtct 10080
tcttctgggg tctgtcccc taaagagcta ggcaaaaagt atgcttgcca catctgttga 10140
aagatagaaa gtttgtctaa aaatacatga gagggaaactg aaacatttca gagaaggcaa 10200
gactcagaag taagaaacca aaagaggaag gtaaaattct agttacaaag aaaagaggaa 10260
tggaatttaa attgtcttac agagaaaatc cagaactgcc ccctcttccc ttactactcc 10320
atcaaaaaag gggaaaaata gtcaatggga aagttttgag aaaaatagat ctctgcattc 10380
ttctgggtga gaattcagac aacttgaact agagagctgg gtaatttctt gactaaaggt 10440

gtgttagatc tgaaagggtt tttcttaaaa ttgtctgtgt tcatccctcc catcttagag 10500
aggaacacag gataagagac ctctggagct ccccagggt caccgagcta ataggatcag 10560
agacaaagct acaaagtcatt tttctgacat ctctccagggt ctcttttttt ctggaccccc 10620
catatcaaca tgatgtatit attacattgg attagcaact ctctttgagc tttcttcagt 10680
accaggttta catctcagtc tgtgggtctc agagaaagta cccaatcagc agcaacatta 10740
cctggaaact catcagaagt gcccctcctc agccccaccc cagatctatg caatcagaaa 10800
ctctggaaat gcaggccagt cctaacaagc ccaccaggga attctgggtgc actaaggttt 10860
gagatccact gatcaaagaa ataatttcc ttttcttcat tataatagca tgaataataa 10920
ctaactgta tttcacaatt taaaaagag ctttatgctc ttgttaaatt tgagggtagt 10980
cttctcaaaa tctctgtgag gctagaaagt cagatattga aacacctgtt ttatgggttc 11040
aaagataggt tcaaaagaga gtaaatgatt gttgggggtg cagggtccaga gagggcagga 11100
tcaaaactgc aattgagtct tctgccttat aaaccagcat agcttcccca aggcacgtca 11160
cttctcgata aaatgggtgac aactagagtgc tcttttcaga tcattcttag aagcatggag 11220
tgctagggtca attgtgtaat tgatgaggaa ataataatac taagaactcc catcttctac 11280
gtccttatat acaatcctgt caggtagaag ctgagtctca gagagaacaa gttgccctcc 11340
caggaccacc aggttaagctc ggcatagctg tgcttagaat gtaggctgtc tggcttctgg 11400
gcttgctgc ccaggagggt tttgtgggtt ctacttggtc atccagatca cagaggggca 11460
gcactgactc ctaccagtg ctcttgactg tacatctaact actttctact aagaaaaccc 11520
cttctcttta gaccaatgggt tttcaaatct tgggtgtgcat tggaatcacc tggaaagctt 11580
gttaaaacac agattgtccc accccaagag tttctgattc tgtaggctgg ggtggggacc 11640
catgaaagtgc catttctaact aagggtccca gtgatgctga tgccaccagt gtgtggacaa 11700
ccctttgagt ggtgaagctc tggacaccct aatttgcaag gctaactagg catatgtggc 11760
aatgaatac gaactgaaat tctgactcca atatcttcac tgatattcct aatccatagc 11820
atacacacag tccattcgt ttccttttta gcttttaact tacatttatc ctttcttctc 11880
ctgccactgc cttctctcca gttagctcaa accaggtaac acataaccgc ctcttaactc 11940
atccgccag ttggtttctt tggctttaat ctagacttct tatctccacc agatttgctc 12000
taccaaagca ccaatttctt aaggcagggt tagaattaaa aatcttctgt tctcctcat 12060
tgcctaaaac tcttaaactt atgattcaag gtcttccatg accttcattg accagtctaa 12120
cgtttttagcc tgtcctaagt gacatgcctc caccacatac ttcatgctt ccactttctt 12180

tctccatgtc ttgtttcatg catttccatt tcttctacct gcgatgtcct ccttcgccat 12240
ctctgtagat ttaaaaatcc tacagggtc atctcaaag ccctttcctt catgaagcct 12300
ttcatgaaat ccccatcgag aggttttccc tctctcage tctccaaagc acagatgtct 12360
gcgtttgtgg ctattatctt acgttgtttt gtattaaaat ttctccagct ttacacattt 12420
gtcatcctct taaggacaaa catcttatta tggatcaatgt gaagctatag aggataattt 12480
aatgaaatat tccaagggt agtcattaca catgactgat ttatctctgt aaactcatcc 12540
acactcatcc acctgatttt gattggccaa gttaatgaat cagagaggaa aagatggtaa 12600
aatataata aaaatctcct aggtagtctc acatcccaca gagccccagg taatgaaatg 12660
aggccctgag ataatacttt atgaacaata aaactccggg ttctattgac agtgaagcaa 12720
gacctgagag agaaggctaa attcccttgt gtctagctgc cacaatcttc tgagaataat 12780
ggcctttcct cccgtctgcc ttctgaatca taggcaaatt tttctctttg gtgatcccta 12840
atacagaaag gggaagtcaa ataaaatata tacaaggaga aggattctgg gagacagagt 12900
ttcttgattc ccttctgcat gctcctcctc aaaagccttt atgagcttac cttacattta 12960
aattctttta aacaaggcat tatgtggtct ggtcttttcc agctccacac accttcacac 13020
tacattcccc ccagctaatt ctgctctggg aacactgacc ttcttttagt tctttgaaca 13080
cattgatttc tggatcaagat gactcagtaa cttcaacctt tgttgtgcc ttggtgctgt 13140
gaagatatag atatatatta accactgcac accagaaatc agaaatagca caacagagaa 13200
taaagtcatt gagccatctt ctgagctcca aaagacaaat tttctccaaa aagacaaatt 13260
caggctctaa aacaatacct taaggaacca gaagtggaat agaaaattaa ggtggtaagc 13320
agggctaaac cacatgcctg ttgagcccag gtttgaaga agacaatggc aggtaggaat 13380
gtggtttctg atgggtaata ggtactgttt tcatttactt tctgttgctt ataacagaat 13440
atctgaaact ggggtgcttta taaagaaaag gaatttatgt cttgcagtta gggaaactga 13500
gaagtcaaaa gttgagggt gcaattgaca agtgccttct tgctgggtggg gatactctga 13560
agagtcttga ggtggtatcg ggcataccac tctcagttag gggactgagc atactaggtc 13620
aggcttttct tctcctttt ataaagctat cagtccact cttatgataa cccattaatc 13680
cattaactga ttagccaatt aatccatgaa tggattaatt cattcatgag ggcagagcct 13740
tcttgacca aacacctctt aaagactcca cctctcaata ctgccacatg ggggattaaa 13800
tttcagcatg agtttttgat gagacaaata ttccaatgat agcagttatt aaaagtacat 13860
gcttgagaga aggggattgg agtcagctc agtgcttaaa ctcaaaagct aggatgagc 13920

tctaacactc ctgaaagaag gagttgctgc tggctcctta ccagggtat atcttttaca 13980
gagcaggaga cctaaagagg caggaggacc cggacatcgt ttggaaacca agcactaaaa 14040
caggccatct gttatacccc caatatcctc tcaggacaag tgttttgaac cactcacaca 14100
aggactagtc tgggcaagtg ggctagatga agaaaccaca aaatagctaa gtggggagag 14160
aaagaccaaa aatactatct tattcaaaat gaaaatacaa tccaaaattc catgattcat 14220
gaagaaatca aatggtatgt gttaggtggt tcttgattg ctatagagaa atacctgaga 14280
ttgggtaatt tataaagaaa agaagtttaa ttggctcata attctgcagg cttcacagga 14340
agcatggtgc tggcatctgc tcagcttctg gagaggcccc aagaagattt gctcaaggca 14400
gaaggttaag ggagagctgg cacatcacat ggtgagaaag gaagctagag agagagtgc 14460
gggtgaggtg ccacaagtta ccacagccag atctcttgag aactcactta ctttcatgag 14520
gacagcacca agccataagg tgtagggagc caaagtccca tgggacatga ccaactcagc 14580
attccactgg aggctatatg atcaaacagc aaactgttta tcacgaatgc aggatgtgag 14640
caaactcaca actggtcctg ccaacagaag gtttgttgga ggcaatcact ccctggtgcc 14700
tgaggtaatc tactgcaaca tctagagaat gcagtcctgc aagcctactc tggacagggc 14760
agctggcacc ttattccatc ccccttctca ctatcttttt ttgcctaata aatacagagg 14820
gctgtgtaaa gctcagggcc cttgtccact agaggcaagt tgccccctga ccccttcttc 14880
caaatatact cttttgtctc ttgtctttta ttctcacatt tgcccccttt gttcagttcc 14940
actaggtccg tgcgggttat atactggtgc cctgagcagc aacagaatca ggctctcaac 15000
aagtgtcatc cgaacatggg actttgagga catgaacgaa gaaggtctgc tggagcagag 15060
gaacagaaat tgacaagggtg aacagggacc ctgggacgag tctgccagca gcggatataa 15120
ggtcagttac ctaaagaggt actgatcagt gccctaaaga gatactggga gcagtgtttt 15180
aaagaagtac tgggaatggg aaattttctg aatcagggtg acaaggggaa gaatttgtct 15240
attaaagaaa aacattatgt gcagttgctt aaagttgtat tggaacagtc tggagcttag 15300
gttaatttgc agacactaac tatcacatgc gtccgtgtga agagagtcca ccaacaggct 15360
ttgtgtgggc aataaagctt tttaatcacc ttggtgcagg tgggctgagt ccaaaaaagg 15420
agtcagcaaa gggagataga ggtggggcag ttttatagga tttgggtagg tagtggaag 15480
ttacagttaa aagtggttat ctcttgtggg cagaggcagg ggtcacaagg tgctgggtgg 15540
ggaaatcatg agactctttt tctgggacag gagtgcaca aggtcaattg atcagttggg 15600
gtggggcagg aacaaatcgc aatggtggaa tgtcatcact taaggcagga actgactatt 15660

tcacttcttt tgtggttctt cagttgtttc gggccatctg gatgtatagt gcagctcaca 15720
ggggatatga tggccttaggt tgggctcaga gacctgacat tcctatcttt ttatattaat 15780
aagaaaaaca aaacaaaata gtggttaagt gttggggcag caaaaatttt ttggggtggt 15840
atgtagagat aaggggcaat gtttctcagg gctgcttcaa gcacgatcac ggtggtgtgg 15900
gaatctagag tgggagagat taagctgaag aaaaattttg gggaaagggg tgatattctg 15960
gggttgtagg aaggagcatt tgtcatatag aatgatgatg gcctggatgt ggttttgtat 16020
gaattgagaa actaaacgga agacacaagg tccaaataag agaaggagaa aaacaggcat 16080
taaaggatta agaattggga ggacacagga catccaatta gagagtgcc aagggggtcc 16140
agtgttaatta ttgcctgga caatgagttt tggggctcta ttaggtgtc atataccagg 16200
ccagattgat ttaggtaaaa acaactct tcatttaaaa tatacagagt cctccttttt 16260
tagcagttag taagttgaga cctattcctg tcttcttata ttaataagta aaataaagca 16320
aaatagaggt gaagtgttg tgtcatgagg ggaacaggaa gcagttcggg cctatttgca 16380
aattgatttt gggggggtaa agaaaactag tgtaccttg cctgtccaat taataagtag 16440
acacatgtag atggaggagc cacagaggaa gaagagaact ttgtaaggca aaactggaaa 16500
tgtaaaggga aaagatgaga gggagcacca aaagagggtg cttgcacca gactcaggga 16560
tctagttaga gcagcagctg ttagagggtg taatggggat taatggggct actgggtaga 16620
gggggaggtt caacttttat ggtgtatgag aaagcgcata gtgtctaca gcaacctttc 16680
attgctattc ataggattgg gtataagtaa acaagaagg ggggctagga ggagagtctg 16740
aagaacaagg ggaaggtagc caaggatgga gtgaaatgta gggcaaatgt cttaaaggaa 16800
atgagagggt ctaagaggag ggctagtggc ttgtaacca catggaagag gttacgaaag 16860
gatgatagaa tggaatgagc ctgtgaggct ggaaggagga attttccttg gtccaagaac 16920
catttgcctt gtgtgggaag agtttgatag gtggaagttt cagtgggagg gtaggcggga 16980
gtgactgatg agaaggagaa aaactggcca taaggacag aagttggaat gctagctgct 17040
cctttagcta ccttatcagc ataagcttg ccctgagtga tgggatctga tgccttttga 17100
tggcgcttgc agtgaatgac ctagcttcc ttggaagtag agcagcttta agaagagttt 17160
ttatgaagaa ggcattaata atggaggacc ctcttatagt gaggaaacct ctttcaggcc 17220
atataacaga atggagggtg agaatatgga aggcataatt agagtcagta taaatactga 17280
cacacaatcc ttttgcaaga gtgagggtc gagttaaggc aatgagttcg gcttgctgag 17340
agggagtgga gtggggcaga gtggtagcct caatgataga tgtgaaagat actatagcgt 17400

agcctgcctt tgctggtgag tggtagtag gcctagtga actgccatca ataaaccaag 17460
tgtgatcaga gtgaggaaca ggaaagaagg aaatatggga aaatggagtg aatgctaggt 17520
ggatcagaga gatacagtca tggggatcag gtgtggtatc aggaataatg tgggaggcca 17580
gattgaagtc caggccagga acaatggtaa ttgtgggaga ctcaacaaag agtgagttca 17640
actgaaggag ccgggggagg gggagagcgg cagaaagtat atgcatcagg tgtgaggaag 17700
aaaatacatt ttgaaagtta tgagaactgt agagagttag ttgatcatag tttgtgattt 17760
tgagggcctt taaaagtatt aaagcagtgg cagctgccac acacagacat gagagccagc 17820
ctaaaacagt aaggtcaatc tgtttagaca gaaaggctgc agggcactgt ccaagctctt 17880
gtgtaaggat tctgaccgca cagccttgta ctttggctgt gtgtaatgaa aagggttggg 17940
atgagttagg gagagctagt gtgggagtag cttctagggc tgtttttaag gaacataaag 18000
aggagtgggg aaaggattta ggatctatgg ggtcagctag gtttcctttt gtgagtttat 18060
gtaatggttt agtcaggatg gcaaaaccag gtatccaaag gtgaaagtac ccaaccatgt 18120
ctaggaagga aaggatttgt tgctttgtag aagggattgg ggtttgggag attagccgga 18180
cacagatcag gagggagagc acttgatatt ttatgaagaa ttatgccgat aggtaacgga 18240
tgaggaagaa atttgggctt tggaggggga tacacgatat tcccttgaga atagatgttg 18300
gaggagcagg aggggtgtcct gttgggaaga ttcataaggag gggctataaa gtagaaggcc 18360
atcaaaatat tgaataagggt gacaagcaga tggacagaaa agtaaattat gagaaagggc 18420
ttgactgaag taatggaggc tgtccctgaa gccttgtggc agtacagccc aggtaagttg 18480
ctgagactga tgggtgtcag ggtcagtcca agtgtaagtg aagagaggct ggggtgaaga 18540
gtgcaaagga atagtaaaga aagcatcttc aagatccaga acagaataat gggttgtgga 18600
gggaggtatt gaggatagga gagtatatgg gtttggcacc acagagtgga taggcaagac 18660
aatttggttg ataagctgaa gatcctggac aggctttagt cccttcaaag cctgttgttg 18720
gatgggatac tggcattgag caggataagg gtaattaggt tttaatggga tggtagggtt 18780
gcgtgatcgg tcaccaagga gggagtagag gtatccata cttgtgggtt aagataggga 18840
gtcaggaggg gaggttgtga aggaggcttt gaactgggga aaagggtggc aatgaggtgt 18900
ggctgtagcc caggaatagt cagggaagca gataatttag ttaaaatgtc tcaatttaat 18960
aaggagctg ggcaggtggg aataactaaa aaggagtgc taaaagaatg ttgtccaagt 19020
tggcaccaga gttggggagt tttaagaggt ttagcagcct gaccatcaat aaccacaaca 19080
gttatggagg caagggaac aggccttga aaggaaagta atatggagtg ggtagcctcc 19140

atattgatta agaaagggac agacttacc tccactgtaa gagttaccca aagtgtctgt 19200
gatgatccag gaggcttctg aggtgatcag gcagtgtcag tcttcagctg ctaagctgag 19260
aagatctggg aaggagtcag tcagagagcc ctgggccaga gttccagggg ctctgggagt 19320
ggctgacggg caagttggac agtccgattt ccaatgcggt cccacacaga tgggatacag 19380
ttaggagga atcctgggct gtaggcattc cttggcccag tggccagatt tctagcattt 19440
gaagcaagat cctggaggaa tgcctgacca cagtggttta ggtgttttga agttcttgtg 19500
tgctggagat gtggctgagg tttttctcac agcagaggca agtaattgca actcagaaat 19560
acattgccac ttggctgtct cttctctatt attgtacacc ttgaaggatga ggttaattaa 19620
gtcctgttgt ggggtttgag ggccataatc taatttttga agctttttta atgttgggag 19680
tggattgggt aataaaatgc atattgagag taagacagcc ttctggcccc tctgaaccta 19740
gggcagtaaa atgtctaaga gttgttgcca aagggaccat ggactgggct gcgttttcat 19800
atttgatgaa aaaaaaagag cctaaatgct aactaatttg ggagaggatca gataaagtaa 19860
aaggaacatt aatcttgact atgccttcag ctcttgccac ctctctaaga ggaaattgtt 19920
gggcaagtgg aggagtgcta gtcgtggaat gaaaccataa gctggactgg gtgtgaggag 19980
gggaggtgat agaaggatta cagcgtaggg gagtagaggc tgaggaagaa ttgggacctg 20040
gctcagcctg gtgaggagtg gcctgggtgag gagcagcctg gggaggagga gagaggttag 20100
atgggttcgt agaaaagaag gattcaaagg actcggagct tgggtgaggag actgaaggaa 20160
cagacaggag agaaagaaga aagatttggg acaagtcgca ttgggagcag agactaggaa 20220
gggagtgatg tgtaaagaat gcctggacat caggcacctc agaccatttg cccattttat 20280
gacaaaaatt atctaagtct tgtaggggtg agaaatcaaa agtgccattt tctggccatt 20340
tggaacaatt atcgagtttg tattggggcc aaatgggtgtt gcagaagaaa ataagatgct 20400
taggttttag gtcaggtgag agttgaagag gtttttaggtt ttttagaaca caggctaagg 20460
cagaagaagg aggaatggag ggtggaaggc tgcccataat aaaaaggtaa gtttagagaa 20520
aagagaggat agagacacag agagaggggg tggtggtact catcagccag gggaggtggt 20580
acttgccacc aaggtgatgg atcaaggcag tcatccccac ggtgatcaga cacctctgaa 20640
atgtgggtga ataatcaggc aggtgtccct gcagtgatta gacaccaagg ggagactgtc 20700
ttcccagtc cgtgaccggt gctggagttt tgagttcaca gataaaacac atctcctctg 20760
tctctaccag aaagggaag gaactgaaat taaggaaggg agagattgaa ggggtggagag 20820
atagcaagag agttggaaaa gagaataaaa agaggccact tactcaattt aaaattggtg 20880

agatgttcct tgggctgac tgaggacca aggttgtagg tggatctcct cacggaatga 20940
gggtgaggac aggggactgg tctccagaag gagttccga gtcctggatc ttcagcacca 21000
aatgtcatgt gcatccatgt gaagagagtc caccaacagg ctttgtgtta tcaataaagc 21060
tttttaatca ccttggtgca ggtgggctga gtctgaaaaa ggagtcagca aagagagata 21120
ggggtgggtc agttttataa gatttgggta ggtagtggaa agttacagtt agaggtgggt 21180
atctcttgag ggcagaggtg ggggtcacia ggtgctgggt ggggaaatcc tgagacttat 21240
catccaggga aggagtgtca caaggtcgat tgatcagttg ggggtggggca ggaacaaatc 21300
gcatggtgga atgtcatcag ttaaggcagg aactcactat ttcacttctt ttgtggttct 21360
tcagtttctt caggccatct ggatgtacac gtgaaggta cggggatata tgatggctta 21420
gcttgggctc agaggcctga cactaacctc ctgcagaagc cacaaaaggt tattacacat 21480
aaaccatggt ttccacaggc aggcactctt gatgtggaaa attgggatag agcaggatta 21540
aaacaagctc atcaaaaagg tcttaaagtt gattcttcag ttttctccac ttggagtta 21600
gttcatactg tacttctgcc attatctcct tattattctg cggaacagca ggctgaatct 21660
aaaaattgga aagaatttgt tgtcctactc acagctcaa ttgaatataa aaaacaggag 21720
agggaggata aaaattggcc tataccgcct cctccagatg cagaaacatc tgtaccatct 21780
ccttcagtgg cagaaataga gatcccagta caaagaattt tatgctctgc tgtcatagct 21840
ggagagccct taggaccttg tgcttttcct atttctgtaa ggcctgatcc aaataatcca 21900
cagcagttta ttcatgaaca ctctccacta gaatttaagt tgttgaagga attaaaaact 21960
agtgtgggtca ataatggagt acaaagccaa tggttcctgg aggaaggaat gctagacata 22020
gaactttggg agcaagtggg gagaaatctt aaacaacacc aggcacaaag gcatcaggtc 22080
ccagtaaaat cttttatgtt aggggctttg agtagagcag ccctggttgt tacacacaaa 22140
agagcctaaa aagggaaggg aggaggaaat gtcacctgcc ttatcacctc cccttcctc 22200
agtccaata tcaactgggcc aaaataacaa agaggaaatg gaggtcttac ctaagcttc 22260
tcctccaata gataggaaga aggacagagg atacgtaca gctatcagtc cctgtcttaa 22320
gcaggcagca ttagaaggag agctcttagc cgggtgcagt ggctcatgcc tataatccca 22380
gcactttggg aggccgaggc aggcagatca tgaggtcagg agatccagac catcctagct 22440
aacatggtga aacccgtct ccaactaaaa taaaaaat tagccaggca tgttgggtggg 22500
cacctgtagc ccagctact tgggaggctg aggcaggaga atggcatgaa ccaggaggt 22560
ggagcttga gctttcagt acctgagatt gcaccactgc actacagcct gggcaacaga 22620

gcaagactcc atctaaaaaa agaagaagaa ggagagctct taacctgctc agtaatgcaa 22680
aatcggcaag gcaatcaggt gtatgtttat aaaaagataa gaaaaaggca ttagaagcca 22740
aaaccacgtg gccaaagcagg cagtgggcag gagaaaatgc tcagaggcag aaaagctcac 22800
agcgacaaag ccaacaaggt ctgcccagga cggcagcatc cctctggcaa aggagcaagg 22860
gagcagcaca gacacaggca aagcctaaac aagtacaatg tggccacctc ccaggacctg 22920
caccactgcc ctctggctct gtgggcagcc cattgcaaaa tttcatgtgt tacatctcag 22980
gctatgattc tctgctaaga tgtaagtaaa atgtaagaat ttgaaaagca tcttttctaa 23040
taatggccac tattgtcatc tctctcctat ccctgatgta gctttccaaa ttcaatttaa 23100
gtaaaacagt aacctttgaa gggaaagaga ttacagaggg cccatgaatt agttgaagag 23160
taattaaag ctaggcattgt aaaaccacac attacgcttt aaagaagaaa tttaaacctt 23220
attaaatgat atttgttaaa ttagaaggta aaaatgttgt gccctgttgg gaacaggccc 23280
ccaaatctgg ccataaactg gccccaaaac aggccataaa caaatctct gcagcaccat 23340
gacatgtttg tgatggccat gatgccacc ttgaaggttg ttggtttact ggaatgaggg 23400
caaggaacac ctggcccacc cagggcagaa aattccttaa aggcatccc aaaccactaa 23460
tgatagcatg agcaatctgt gccttaagga catgttcctg ctgcagacag ctagccagag 23520
cccatccctt tgttttggcc catccctttg ttcccataa ggaatgcttt cagttaatct 23580
atgatctata gaaacgatgc ttatcactgg ctgctgtca ataaatatgg gagtaaaact 23640
ctgttcaggg ctttcagctc agaaagccat aagccccctg atttcccact tcccaccctt 23700
tatttctgtg tgtgtgtctt gaattcctct agcgcctctg ggttatggtc tccacaacca 23760
cgctggctctt ggcagtgcc ttctcagaaa gtgaaaaaga gttgtatgta agtgtagtga 23820
aaacataagc atgaatcact gtcttaacct actgattaga tagtctttga tttgtacttg 23880
ctaaaagagt cctaaattga gttcctcagc tagtgagtca ctgttttcaa gactgtttgc 23940
cagattgaag tccataaact tggtcagccc gaaaactcaa ttacaagatc taagctattc 24000
tgcctgtggc tttaagcaca tggttaaagt atattattta agtctctcct tctagatatg 24060
ctttcagatt ttctttttta acttcttggt acttatttca gctttccata ttgataatta 24120
atgcagtcaa ttgctcagtt atgactgtga tatcatcagg attcctttta gtaaaaggca 24180
attcaaagcg gtattgcact ccccatacc taatgcttta aactgttta ctgatgggtc 24240
tggtaaacat ggaaaagctg cagtctagta gagaccacat aattcaatca ctgatctga 24300
gttcactagc actcagagag ctaaggttac tctgtttatt tattaaagaa tttttacaac 24360

cttaagctca ctctggactt tccagcctta tgtggcaaat gtagccatca atttatgggg 24420
tcaagactta cttacagcat gggatatgag gcttacaaat gagactttga taaccagga 24480
ttttaaatgt tgaagaacac gggatatcag agtgaaaaag gtttagggaa aattctgaca 24540
agggaaaatt ctaacctgat atcaataact ggaaagacag gttaaaccct gcaaggggat 24600
acattgacat tttttcttcc tcacttgctc ttttctgctg tctgaatatg ggcatgaggg 24660
caagagtcac ttttagaccac caagtacac ttaggataga agccttatac tagagggtgt 24720
gggaaagaaa aaacagaagg actcataaag aaaaaataa taaacctcag tattaagatg 24780
gaaaaattcc cccaatttgt ctatagggtg aacttcacat ctattaaatt tcagctatgt 24840
ttttgcagaa tttgatatgc tgatcataaa atttatatga aaatgcaaga gacacagaat 24900
agtcaaaact ttgaaaagaa gaaagtgtga ggacttacac ttgttgattt taaggctttt 24960
tacaagcta taataatcaa gacaatgtgt tactgacata atgatagaca tattgatcaa 25020
tatagacaat ggatgaatgg agtagaattg acagtctaga aataaaacct tatatatatg 25080
gtcaatttat ttctttatgt attctgtcat ccagaatata taaagaacac cttcaactca 25140
ataacaacaa taccaacaag ggtgccaaga ccaatcaatg gaggaataa tagtcttttc 25200
aagaaatttt gctgagacaa ctaagtattt atatgcaaaa taatgagttt gaatggctac 25260
catatacaaa aattaactca aatggactat attaggtcag tgcaacagta attgcagttt 25320
accaccatta ctgtttttt ttttttggtt ttttttttg agacagagtc ttgctctgtc 25380
accagacca gagtgcagtg gcatgatctc agctcactgc aagctccact tcctgagttc 25440
acgccattct ccttcctcag cctcctgagt agctgggact acaggcatct gggtaatttt 25500
tttgatattt tagtggagat ggagtttcac catgttagcc aggatggtct caatctcttg 25560
acctcgtgat ctgccacct cagcctcca aagtgcagg attacaggca tgagccacca 25620
cgctggcct accattactt ttaatggcaa aaatgcagtt acttttgac caccctaata 25680
gaactaaatg taagagctaa aactacaaa ctgttagaag aaagcatagg agcaaattct 25740
aatgacatga gagttggcaa ttgtttttta gatatgacac caaaagcatc aaggacaaaa 25800
gaaaaaatg gataaattgg acttcctcca aattaagaga acttttgtcc tgcaagcaat 25860
actattaaga aagtgaaaag acaagtcaca aaatgggaga acatttttgc acataatata 25920
tttaataata ggctgacatc cagaatacat aaatacctac aactcaatac caaaaagaca 25980
gccaattta aaaatgggcc aaggatatga ataaacattt ctctaaagaa gatacaaaaa 26040
tggtcaatat gcacatgaaa agatgctcaa tatcaatctc tattaggaaa atacaaatta 26100

aaacacaaaa tataaaacac aagatatcaa ttacactca ccaggatggc tgttatcaaa 26160
aagacagata acaagtattg gcaaggattt ggggaaattg taaccttcat acattgctgg 26220
taggaatata aaatttgcag caggtttggg aaacagtta gcagtttctc aaaaagcctg 26280
ggcatggtgg ctcatgccta caatcccagt gctttaggga gctgaggtga gaggattgct 26340
tgagcccagg agttggagac cagcctgagt aacacagtga gacctcttt ctacaaaaa 26400
gaagagagtt aaacataggg taccatataa gccagcaatc catctcctag atatgtacc 26460
aagaaagttg aaaacatata ctgacacaaa aacttacata tgaatcttca tattagcctt 26520
ataataatag ccaaaaagta gaaacaacc aaatacccat caactaatta aaatatggtg 26580
tatctataca tattatttgg ccataaaagg aagtactgat acatgtcata acacaaatga 26640
accttggaag cactatgatc tctgtattag tcagctcttg tattgctata aagaactacc 26700
tgagactggg taacttataa agaaaaaggc ttaattgagt cacagttcca caggctgcac 26760
agggatcatg gccaggaga cctcaggaaa cacagttatg atggaaggaa gagagtgaag 26820
gaggaggtgc tacatacttt taaaccacca gatcttgtga gaagtcactc actatcatga 26880
gaacagcaag ggagaagtcc acccccatga tccagtcagc ccagccagg cccaactcc 26940
aatattgggg attacaattc cacatgagat ttgggtgggg acactaatcc aaacaatatc 27000
attctgcccc agcccctccc aaatcctgtg tccttctcac attggaagat acaatcatcc 27060
cttctcaaca gtttcatttc agtattaact caaaaatcca aagtctcatc tgagacaaga 27120
caagtccctt ccacctatga gcctataaga tcaaaaagaa gttagttact tccaagatac 27180
aatggaggta caggcatagg gcaaatatat ccattccaaa agggaaaaat tagccaaaac 27240
aaaggggcca caggccccac gcaagtccaa aatcaagcag ggaaatcatt aaatcttaaa 27300
gcttcaaaat gatatccttt gactccatgt ctcatatcca ggccacacca atgcaaggag 27360
tgtgctcca aggccttggg cagctctacc ctgttgctct acagggtata gccccatgg 27420
ctgctttcac aggttgcat tgagtgcctc cagcttttcc aggtacacag tgcaagctgt 27480
tagtggatct accattctag ggtctggaag attgtggccc tcttctcata gctccagtag 27540
acagtgcccc agtggggaat ctgtatgggg gctgcaacc cacatttctc ctctgcactg 27600
cccaatagag gttctccatg agggctccat tcctgtagca tacttctacc tggacatcca 27660
ggtgttttca tacatcctct aaaatctagg taggggctcc caagccttaa ctcttgccct 27720
ctgcacatcc gcaggcttaa taccacatgg aaaccaccaa tgcttatggc ttgcacccta 27780
tgaagcagta gtctgagaca tatctgggcc cttttggcca tggctgggat gcagggaaca 27840

gtgtcctgaa gtggcacagg gcagcggggc catgggcctg gcccatgaaa ctttctttcc 27900
tcctaggcct ccagacctgt gatgggaggg tctgcctcga cggctctctag aatgtgtttg 27960
aggcatattc ctcatgtct tggctattaa tatttggctc ctctttactt atgcaaattt 28020
ctacagcctg attaatcct ttcaaaaaa atggggtttt cttttctact acatgggtcag 28080
gtcacaatt ttcaaaactt ttacgcttcc ctttgaaatg taagtccag ttgcagggtca 28140
tttctttgat cacaaatata agcatatatt tgtagaatca gccaggccac atcttgaatg 28200
ttttgctgct tagaaactgc ttccaccaga taccctaaat cattgctatc aggttcaaaa 28260
ttctacatat ctctagggca agggcacaaat gcctccaaga ctttgctaa tgcataagaa 28320
aattgacctt tgctccagtt cccaataagt tccccatctt catctgaggt ctcttagcc 28380
tggacttcat tgtccatata agtatcagca ttttcatcac aataatttaa ctagtctcta 28440
agaagttcca aactttccct tatcttcta tcttctctg agccctcaa actgctcaa 28500
cctctgccca ttaccgggt tcaaagctg cttccacatt ttcggtatct ttatagcaat 28560
gtccattcc tgataccaat tttctgtatt agtctcttct cgactcctg taaagaacta 28620
cctgagactg ggtaatttat aaagaaaaga ggtttaattg actcacagtt ccacaagctg 28680
tataggaagc atggttcaga aggccacagg aaacttaca tcatggagga aggcgaagag 28740
aaagaaggca cgtcttacgt ggctggagta ggaggaagag agtgaagggg gaggtgttac 28800
acacttttaa acaaccagat cttgtgagaa ctcttact atcatgagaa cagcaaggga 28860
gaggtctgcc tccatgatcc aatcacctcc taccaggctc ctctccaac attggggatt 28920
atgatttgac atgagatttg ggtagggaca caactcaaa ccatatcaat cccatttata 28980
tgaaatgtcc acaatagata aatctataga gacataaaat agattggtgc ttgcctagt 29040
ctggacgtga caggagggtg tgagtaaaag aggcaatgga gtgataggta cagggtttct 29100
ttttggggtg atgaaaatat tataaaatta gattgtggtt atagtgtat aactcttgaa 29160
taccataaaa atatattgaa ttttccattt ccattttaaa tgggtgaatc ttatggtatg 29220
tgaattatat ctcaataaaa ctgcaaaaaa tgcacaattt gcaattgcaa aaatatggaa 29280
ccagtcaaaa tgccatcaa tgagtggata aaggaaactgt ggtatatata tatatatata 29340
tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata cacacacaca caccatggaa 29400
tactactcag ccataaaagg gaataaaaca atggcattct cagcaacctg gatggaattg 29460
gagaccatta ttctaagtga aataactcag taatggaaaa ccgaatatca tacattctca 29520
ctcataagtg ggagctaagc tatgaggatg caaaggcata agaataat aatggacttt 29580

gggaactcag ggaaaggggtg agagaggggt gaggaataaa aggctaccca ttgggtacag 29640
tgtacactgt tcaagtgtatg gctgcaccaa aatctcagaa atcaccacta aagaacttat 29700
ttacataacc aaataccacc tgtttctcaa aaacctattg aaattaatta atttttaaaa 29760
actgctgaaa tcaatagtga aaggatggac tattcaataa tgacacagtt aattgaatat 29820
catattttta aaattagatc cttacctcac actataacat aacaataaat tccagggtgaa 29880
ttatagacca aatatgaaaa gcaaaatttt aatatttttag aagacaatth ttatgacctt 29940
aagttagaaa atgattttta aaaacaggat gcaaaaacac taatcataaa gagatattht 30000
aggccaagca tgggtggctca cacctgtaat cctagtactt tgggaagctg aggcagggtg 30060
atcacttgag gtcaggagtt caagacaagc ctggccaata gggtgaaaca tgtctctact 30120
aaaaatacaa aaattagctg gaaatcgctc gaaccagga ggcagaggtt gcagtgaact 30180
gagattgtgc cactgcactc cagcctgggt gagagagaga gactccacct caaaaaata 30240
aataaataaa aataaagaga gattttaata aggtgcatta aaataaaaaa ctatccatca 30300
aagacaccat gaataaagtt aaaataggcc acaatgagaa tatatttgcc atgaattttt 30360
tctttttttt tgagatggag tcttgctctg tcaccagga tggagtgcag tggtgcaatc 30420
tcggcttact gcaaacttca cctcccaggt tcaagcaatt ctctgcctc agcctcctga 30480
gtagctggga ttacaggtgt gtgccacat gcctggctaa tttttgtatt tttgtagac 30540
acggggtttc accatgttgg tcaggctgag ctcaaaccct tgacctctg atccaccttc 30600
ctcagcctcc caaagtgtg ggattacagg catgagccac cgtgcctggc ctacatgaa 30660
tattttttta aaggtagcat ccagaattaa taatcttctc caacaaatth cattagtagt 30720
cagggaactg caaattaaaa tcaaagtaa atactactth ccactcatta gactaaaatc 30780
cattcaagtc tgataatacc tagtactgag ttggagtaat agaaactgct aatgggacag 30840
ttagttggtc atcactttgg agagaaatta gtcagtatct agtaaaagtt agtgatacac 30900
cttccattth catctgttct gtgctgctac caaagaatac ctgagactag gtaatttata 30960
aataatagaa atgtatttct aatggttcta gaggctgaga agtccaagat tgaagggcca 31020
gcctctgcag agagccttct tgctgtgtca tgccatggca gaagggcaa gagagggcaa 31080
gagagagcaa aagcaaattc acagcatcaa tcccttttat aatcagcatt actctattaa 31140
tgagggcaag accctcatgg cctaatacct tctaaaaggt cacacctctt aatactattg 31200
caatggtaat taagtttcta atacatactt ttggggagac attttcaaac tatagcacct 31260
accctatagc ccaacatttc tactcctagg agtatgcct agagaaattc tgcataaata 31320

tctaaagaga ggccattggt gcattgttag gtactggaaa attggaatca attactatgt 31380
ctaccagcag cagaagatgg ctttttaaaa gttttggttt attcatgaaa tggaatattg 31440
cataaagtat gtcctatctc accagatgaa aacatttttc actaggacta tttcaaaagt 31500
agtctttatca ctgggcttct ctattatgca taaaaatttt aagtgaacat gttctttgac 31560
ctagtactcc tacttttagg aatttgccca aaagggacaa ttatactact gggataaatc 31620
tttgaatcat aaagtaagtt gtaaattgta caagcagtat gtctttatttt tattttaaagc 31680
acattaacaa tattacacat atagtaaaaa ataaataaat aaaacatgtg aataataaac 31740
accaattta gaacaagtgt tgacagtgga gagggaaaga gagagaaaga aggagaaatg 31800
gggagtggga gcgggtacac aaggaaattt tagttgcagc tccaaatttt tactttttac 31860
acaatgaagc gaatatggca aaataagatt tgttaaagtt gggcagcagg tacacagata 31920
ttctatcatt atcctttgaa tatttctgta gatttaagtt gtccattaaa aaaataaaat 31980
acacacataa tttttaagat tagttttttc tatttcctgg ccttcgcatg cactgttaac 32040
tttacctgga attctttatg cagtaattaa gagcaaaggt gtagagcaag actgcttgag 32100
cttggatccc agcactgagt tgatttaggg agaataactt aatctcttaa tccaagaga 32160
aaatatgata taatagtttt gagtcataa agttttcata agcattaaat gtgacctata 32220
tatgtaaagc aatctaacag tgcctatagt atttataagt gtctgcatta ccaaattcat 32280
cattatcatg gcatgtcatg tcaccatcca ctacattacc atcactgtca ccatcatcat 32340
catcaccacc accatcatca ttaactccct ttgtctagtc aattcatatt tgttcttcgt 32400
attttagata cctgttaaaa tattttttca aagatgtcta ctctgattct tcagtacaaa 32460
tttgatttaa taagatccta tcattttgtc caaatactta taaaaatttg tagttctata 32520
tttaatgtgt ttgtttgtt taacatctct ctctacatt gtgttaagtt ttttaaagag 32580
aaggtaaggg ttaaagagag acatagagag agaaagagag acagagagag agagagagcg 32640
gttctacagc aatacaggta tattagaaaa acctgcaaag gtggggacca gcttaatgcc 32700
agagcccccc actgcttata ggctggggta cttataggtc tgggggtact tataggcctg 32760
ggtgggtggg gtctgagcag tatggcttgc tgcccaagaa gatgttgata agacgttccc 32820
atgatgaggc agtttggtcc ttgcttccat agagtgtgat gcttcttgca ctttttccca 32880
gcagaatgtg gtagggatgt tccttcaggt gggcctttgc ctggcagggt atgataagga 32940
tgttcctgtg ccttggaatc aggtagttag acaggatgtt tctcacagcc tgaaccccca 33000
tggaatgttt cactttgacc aggtctgcg aaatagcagg gggcttacia aatggtgtag 33060

tttggactaa caccttggaa cacaaaagtt tcttggggcc aaggctggcg tattagtctg 33120
ttttcatgct gctagtaaag acatacctga gactgggtaa ttataaaga gaaaagaggt 33180
ttaatggact cacaattcca catggctgga ggcctcaca tcatgaggga ggcaaaggag 33240
gagcaaaggc acgtcttaca tgggtgtagg caagagaacg tgtgcagggg aactgccctt 33300
tataaaacca tcagatcttg tgatacttat tcactatcaa aagaacagca cgggaaaaat 33360
ctgcctccat gattcaatta cctcccacca gattcctccc atgacatgtg gtaattatgg 33420
gaactacaat tcaagatgaa atttgggtgg ggacacagtc aaaccatatc agctgggtat 33480
gttttattca cctttttata cccattgtca tgtcttctgg acaacaatg gatgtaaaat 33540
ggtatagact cctgagtact catttgttga atgacaaatc tatgaaccat ttgaccagta 33600
tgcagcagcc attaaaatta tgtttatgaa taatttacag catggaaaaa tttgggggtg 33660
ctagtagaaa aacaaaaagg tacaaaagga tatatataat aagcctacaa tgccatataa 33720
acaatactaa cagcaaaaac aaacctataa attgggggaa gatggggcag atagaagtaa 33780
cctaaaatac taacatgttg ttttggggtc atgaaattat aatgattat gcaccctta 33840
atttttactt tctatgtttg atttttctat ggtaaattgca tttttattga ggtggaattc 33900
acataacatg aatgaaaaa tttagtggca tttattatat tcacaatatt gtacaaccac 33960
tagctctact tccaaaacat tttcatcact ccaaaataaa acctgtacc cattaagcag 34020
ttactcccca ttatttcctc tcttagctcc tagcaaccac caacctgctt tctgtctcta 34080
gggatttatt tattctggat attccataaa aatggaggca caatatgtac cttttatgtc 34140
tggtctcttt caccaagcat gtttttgagg ctaatccaca ttgcagcatg tatcagtact 34200
tcatttcttt ttatgaataa ctgtatacag accacaattt gttatccatt ttttggttta 34260
tggacatttg ggttgtttcc atctctcaac tattgtgaat agtgctgcta tgtatatattg 34320
tgtacaagaa tttggttacc tattttcaat tcttttatgt atatatctaa gatgaaattg 34380
cagggttata tgctaaccct atgttttagca ttttttttta ggaaccatta aactgttttc 34440
caaacttgat gccccatttt atattcctac tagcaatgta agcaagttcc aatttctcca 34500
tatcctcaac aacacttggt attttctatt tttgttatag ccattctaatt gagtgtaaag 34560
tgatatatca ttgtggtttt ctttgcatth tccttatgaa cattgatgtt gagtaccttt 34620
tcatgtactt tttggtcatt tatatatcat ctttgagaaa atgcctcttc gtgtatgttt 34680
tgcccattht aaaactagat tgtctttgtt gttgacatgc atgcattctt taaatattct 34740
gcatactagg cccttatcag atatatgatt tgcaaatgtt ttttctcatt ttactggctg 34800

tcttttact ttattgataa tgtcctttga tgcccaaaag ttgtttatit tgatgaagca 34860
tatttatcaa tttatttctt ttattgctca tgcttttgat gtcacctcta agaatttata 34920
accaaatcag aggtaatgaa gggtttacccc tctattttct tctaagagtt ttatagtttt 34980
gactcattta cttaggtcgc tgattcattt ttagttaatt tttgcatatg atgtgaggaa 35040
gaggccaac tttactcatt tgcatgtgga tattcagctg tgccagcacc atttgtgaag 35100
agtctatcat ctctcattt aataatagta ttgacacctt tgttgaaagt caattgataa 35160
taaagtatg agtttatttc tggaatctaa attctattcc attgatctac atgtctatcc 35220
ttgtatcagt atcacactat cttgattact gtagatttgt agtaagtttt gaaactagaa 35280
agtgtgagta ctgcaatatt cttctttttc ttttttaaag attgtcaggg cctcttgcaa 35340
tttaataggg atatgaggat tgacttttct attctacaaa attaaaattt tgtagagat 35400
tgcatlgaca ctgtaggtag ctttcagtaa cattgccatc tcaacaattt taagtattct 35460
aatacatgaa tatgagcttt ctttctcttt atttaggtct tctttaattt ctttcagcag 35520
tgttttgtag ttttggggta caagtcttc acctttaaat tttggtgaaa tttattccta 35580
ggtattgcat ttttttatgc tattgtaaat aaaattattt tctcaatttc ctgttgatg 35640
ttcattgcag gtgtatagaa actcaactga ttctttgtgt tgatcttatg ctgagaccag 35700
ctcagttggg gagaccctaa cctagaagca ctagaggaat taaagacaca aacacagaaa 35760
tatagaggtg taaagtggga aatcaggcgt ctacagcct tcagagctga gagcttcaaa 35820
cagagattta cccacatatt tattaacagc aagccagtca ttagcattgt ttctatagat 35880
attagattaa ctaaaagtat cccttatggg aaacgaaggg aagggtgaa ataaagggat 35940
gggttgggct agttatctgc agcaggagca tgtccttaag tcatagatca ctcatgctat 36000
tgtttgtggt ttaagaatgc ctttaagcgg ttttctgccc tgtgtgggac aggtgttcct 36060
tgccctcatt ccggttaagc cacaaccttc cagcgtgggc attatggcca tcatgaacat 36120
gtcacggtgc tgcagcgggt tttatggcca gttttggggc cagtttatgg ccagattttg 36180
gggggcctgt tccaacaat cttatactt gcaattttgc tgaatttgct tgtaacttt 36240
gatagttttt ttgaggatta tttgggattt tctacatatc atgtcatctg tgaataaaga 36300
tagttttgct tctttctttc tcatgttgat gccttttatt tccttttctt gcctaatttc 36360
cctggctaga acttccagta tgatgttgaa taacctgggt gaaatgggca ttcttgtctt 36420
tttctgatg ttagagagaa atttttcagt ctttaacct tgagtataat gttagctgtg 36480
ggttttttac aaatatcttt tatcatgttg aggaagttcc ttctactcc tacttcttgg 36540

agtgtttttg atataaaggg tatttaattt gtcaaagct ttttctgtgt cagttgagat 36600
tatcatgtga gatttttttt ccttcattct attagtgttg atgttacatt ggttgatttt 36660
ttatgttgta ctacatttgc attctttata taaatttcac ttggatcatgg tgtataaccc 36720
ttttaatatg ccattggatt tagtttgcta gtattttgtt tagagttttt gcatctatat 36780
tcataagcaa tatcagtcca caggtttttt gtggttttatt tgtctggcctt tgctataatg 36840
gtaatgctgt cttcttagaa tgaatgaggg agtgttttct cctctttcat tttttaaacg 36900
tttgagaagg agtgatatta atttttcttt aaatgtttgg tagaacttac cagtgaagcc 36960
gtctggttct taacattttt ctgtgttggg aggtttctga ttaccaattt gatctcttta 37020
atttttacag atcttttcag attttctatt tcttcttgag taacttttta gcaatttatg 37080
tattttagaa atttgttcat ttaatctagg ttatttaatt tattgggtgtg cattttttca 37140
tagtattatc ttataatctt ttaatttttg taaagttgat aatgtcccca ccttacctga 37200
tcttagttat ttgtgtcttc tctgtattct ttttgtcttc ttcttctgtc ttagcatagc 37260
taaaggtttg tcaactttgt tgatctttta aagagtcaac ttttgctttc agcatgcatt 37320
actttttaaa tagaaatata tacacctaag ttgcattaca aaggagtgtt cctccacaca 37380
cttattcttt cccaccatca gaggtttatg gtccccgcaa aagtcacat cagttgggct 37440
caactccaat cagtcatggg aggtcagggt ccatctcatt gtctccatca ctcatgccca 37500
cccagggtta gtctaactat gttcaccaat cagaacctct gccacatcag ctctgtgggt 37560
ttctctcat gccatctga ccaacaatga gcacagtctg ggtttcctga tgttttctat 37620
agcatgggtgc ccctccctgg gacacctcag aagccacaat gatattcatt aaacttcttc 37680
ctgcaagtac tccctctatt gtccttcta ctcaccaagc ttagtgtcag ggaatatgct 37740
ggtggggagt atgaatctta gcttctcact ccagactcg gctcccaacc tgctgttgcc 37800
aagtcttggg gacatctata aatgccttct aaatacctgt cttggcctat cccagccac 37860
agattcctcc ctagagcagg ctaccttga ggcatctata ctgagatctt aatcacagag 37920
acatttaaaa catctaggct acaaaagaat tcctactata gggttcaaatt gaatttcttt 37980
ccgtcacttg agacagcttt ttagcaagta catgtattaa agattctgat ttcccctttt 38040
ttctcctaca gtttgtttgg cctaaaggta tgacatctaa tctgctgcat ttacactcta 38100
agtcaaaatt accattttgt tcttttaatt tctatttcta atcatacatt cttgtctact 38160
cctggttcat ctggagacaa agttgaactt agaagatgga ggagaaattc ttatctgccc 38220
tctgctagtt gacacttctt ttccaagaat catttgcagt tgctgggctt tcttctgtgtg 38280

actctatgcc ctgttgtgtt actttttcat ttgtgacaaa aacagtggta atagtttgct 38340
tcatttttat tatgaagact tgaccaggat aggtaggaac ataattactg ctttttctgt 38400
gggcatcata ttggtccaga tcatgtttta ccagaattga agatgtaaaa tcctagaact 38460
cactaatcta ttttagtagg tcacaggaag catgcaaacc ataaaaaccg caatgaacca 38520
aaagcatctg tgttgacaag aggcaagaat ttctctattt tctaaaggca ctaactgaac 38580
aatctattg cccattactt aggaaattgc taagggcatc gttaaagtac ttcaggctgt 38640
tgaaaaacct ttctgtctt cttgccccac caccaattct ctctagctat gctttctctc 38700
acatgttctt gccatccatg gagtggcaga gaggttctga gtacaactct aactttcagt 38760
ttcaatggcc taatcccca ctcaactgct gaccttgagt gtaaaaataa acaagatctt 38820
aaacatctta gggccagcat tctgggtctt cttttgttat ttggggagca taaactattc 38880
tcatatcatt ggcttgcaaa aaaattgagc ttctctctt ccttgcccca tgtcaccttg 38940
aggtgaccac agccctgcct tctatgtaat cctgcttggt cagcaggcac atcagagctc 39000
agtggcttgt gacatacttt ccttcaagcc tgctcgaagg gccatactca tcattgagac 39060
tggaacctt agaaaccatg aaccagtgct caatgggtag atacagaatt ctcaaactca 39120
tgaaaaaaca tcctttttta ctctctccgt gtgcataaag aattctaaga tgtactgac 39180
aagattccca attttctaac tatctattaa tatatggacg aggtagaaga aaagttgcaa 39240
gaaaaaaatt tgtttgactt gacggttgtg tggttatttg ccacactccc ccagatccac 39300
tctgagtccc aggatgctga ttttaggggc tacattgcct agactgtcca ttattccctc 39360
ttcccatctg gttcagtcac tgggaagcac tggtaggagg tcagagtggg agaaggaggt 39420
taggatactt tctgcccctg ctgtctact gctttgctga acttctagca gtggctgagc 39480
catcaacctg cagctctcaa ttccagctgt ctgtagcact caagtggat tgtttattct 39540
tttgatcctt ctagctgtta aggaagaaaa aaataatttt ttctcaatg ctcataagtt 39600
cttggaatgg acccctgtaa caaaagacag attaacacga gaaaagtta ttaacgtaca 39660
tattttatac gtacatagga gctatccagg gaatgaataa ttcttaaaaa ggtgactttg 39720
aattccagct catatagcat cttcaacaaa gttcagtaac atttagaga tatgacaaga 39780
caaagaaaat gaactttgag cctctaggga cagtgacttg taggaaggca aaaggaataa 39840
atggaggtaa aggctggta gtaatacttg ttaatgaaga ttctctggt gccatctcca 39900
ggtccacaag gatitaaatt tgtcttcagt ggtgaacctt tgttcaccct ggcagaaggt 39960
gtggaggggg gtgcagatcc gttttgtctt tgtaagtcta tatcctgctt ttagacaaat 40020

aaagggaggg aaaagagctt tccttcatt gcttcttaat tgccttcagc tcaacaatcc 40080
ttatgcaaaa gaggtacatt ttaggggtgc aaattctggc ctcccacaaa gcatagggat 40140
gacagaccac ctcaccatcc ctgttgcttc ttttaagcct gctcaccct ccaaaaatat 40200
tttcattcta tactgtctct tcaaaatctc agcggagggt gccctctgtt atcctgccct 40260
ctgtgtcagt ataagccaaa gggttgatc ctggctctgc aactatctac ctctgtgcct 40320
ctccttgttt atgaaattac agggctggag acaagatca caatgtgaag acaaaattgg 40380
agagcgggcc taatcagcca gagcaaaatt tctggctctt gctcttcccc atcctgggtt 40440
gaatcatagg aacaggtggc aagatgccag ggtcaggaga ttccagaagt ggcagcaagc 40500
tcagtgttac caggtcaggg atgacctgc ttattattga aatctcagag atatgctcca 40560
attccggccc agagacacat tgagagacaa ctggggaact tgctatgttc ctgaacaggc 40620
aatgagctgt ctccaagaa aaaacctgag accttcaag tctcaggtct tacttagcac 40680
atataccagg tcttacacag gacacatggc tacaactgac tgaaatctgg gctgggtgta 40740
ggagctcaca cctgtaatcc cagcccttca ggaggctgag gcaggcagat tgcctgagcc 40800
caggagtctg agaccagccc gggcaacatg aaaaacccc atctctacaa aaaatagtca 40860
ggcatggtgg catgcacctg tagtctcagc tacttgggag gctgagatga gaggattgct 40920
tgaggttgag actgcagtga agcatgatca tgccaccgca ctccagccta ggcaacagag 40980
caagatcttg tcgcaaaaga aagcaaaaac acaacataac acaacaaca caacaacaac 41040
aacaacagca aaaaagccaa cttcttgaaa tctggaaagg acacctggac tgccctgagc 41100
atttgattgt tgttggctct agcagtggat gcatccttca acctctggca ctctgcaggg 41160
ctcagactgt tctgttctgt ttgttacctg tggagtgcct gccagaccct gctctagctg 41220
ctttagggtcc attaccctc atagaccccc agtcttgta ttcatatttc atatttggga 41280
aatggaaaact tagaaacttg ccaagtccac agcatgagat cctgcctccg gtgtctgctg 41340
gattccagaa agtgccaggg gccaaacttag atgacaccat gttctctgca caatcttagg 41400
aatgctccta gtctgatgtc ccattgcaa aatttacatt atcttttaac aaaacgtctt 41460
tccaaggagg ggcatttaaa ataactgagg ttcttcttgc taaggacgtt cctgacacaa 41520
gagataattt agcatttcct tttcattaaa aagtttgaaa tcctgtaatt tgtgataatg 41580
tggatgaacc tagaggatgt taagtgaat aagccacaca cagatagaca aataccacgt 41640
gatctcactc ttatgtggaa tttttttta aataagttgc ttagccgggc atgatggcac 41700
acacctgtaa tcctagctac tcaggaggct gaggtgggag gatggcttga actcagaagg 41760

tggaggtagc agtgagctga gactgtgccg gtgcactccg gtctgggtga cagaatgaaa 41820
cccaatttaa aaaaaaaaaa aaagttgcta tcttagaaaa agacagtaga gcagtggtta 41880
ccagagactg gggaggaaaag agaggaggtg agaatgggca gcagttgatc aacgggtaca 41940
aagttacat gagataggag aaacaagtgc tgggtgctctg ctccaagtag ggtgacggta 42000
gttaataatg aattctgtat atataaatag ctagaagaga gggttttcaa tatcattatt 42060
atttcaaaag aatgataaa tgtttcagag gatggatatg taattaccct gatttgatca 42120
ttgcacaatg tatacatgta gcaaaacatc acattgtgtc ccataaatat atacaattat 42180
tatgtgaatt aaataaaaaa aaattttaaa gtcttatcta aatgaaattt ctaaccagat 42240
tctgaatcca tgataccact gaaaccagca cacatgatcg cagtaaaacc tcattatact 42300
tcctccacta tcaccaatac cctttattct ctggaacatg aaacattctg ttgtgctcat 42360
atcatgcaaa ttactactag taggagagca gagagtggaa atgttccagg tataaagacc 42420
cacaagataa agaagctcag agtcggttaga aacaggagca gatgtacagg gtttgccctga 42480
ctcacactca aggttgcata agcaagattt caaaattaat cctattctgg agacctcaac 42540
ccaatgtaca atgttcctga ctggaaaaga agaactatat ttttctgatt tttttttca 42600
aatctttacc attagttgcc ctgtatctcc gccttcactt tctgcaggaa actttatttc 42660
ctacttctgc atgccaagtt tctacctcta gatctgtttg gttcagttgc tgagaagcct 42720
gacataccag gactgcctga gacaagccac aagctgggtga gttgtaggca ttttttccat 42780
tactttctga ttcataggct caacgcacct caaagctgga aatgccgggt ctgggtacac 42840
cctggggaac tgcaaagcct gcacacttgg gggaaatgat caagatgaga ggcaggggtg 42900
gggatggcat gtgcaccagg agatgttaga gaaacctga ggaagagcag cgtgcagcag 42960
gtgatggggg agagtgggca gcaagcgagg ccaggacagc cactctgctc agtcaccagt 43020
ccacacacc agggtctcac tctgcccctc tgagcaccca aggacgttaa agagctggaa 43080
ctgttagtct aatatagga ccatccaagc tctgaaccaa aatgtgtccc ttgcctcaac 43140
tcaggagatc cacagaggca gaagtaagga atttatittc tgaaagatag atttctatca 43200
gttctgggtg acatgttctg acacttgaaa tgacacctag gacagcacat ttcaggcatc 43260
ttgctcattg ttactgtag tagaagctac atgctagcca gttgtaaaaa tgaaattaag 43320
taatgtgtgc acagcatita acatagcatc tgagcttcag gagcactcaa ttaatgacca 43380
cagttgtgat tctttaggca gatgcatttt tttccaactt tgatcagagg tcttatttag 43440
cttctccaga tttcaagaat ctggctcagt gatatgaaat acaagacttg tgaaaagtgt 43500

caattgcaag agaaatggaa ggataaagta tacaggtggg tggaaaagaa attcacagtc 43560
actgccagaa aaaaaattct tgagaatcaa gtcctgatga tgtagggct tatagttctt 43620
attataaaga gttttatgta ctcatcagt gaacatttat tgggtgcctcc ttagccagg 43680
tactatcata agagctgaaa ataaaagcat aatccagtc ttagcttga ggaacatgct 43740
gtgtgtagca gataacataa taagtctta tctagatgca tgcagtgtta tgtgataaga 43800
gtaatatgac agaggataca gattaggctt cacagagaag ggggatttga gcaggaggta 43860
ttgaagggtg aatagaagct caccaatcat tttgggcaga ggggcaagga cctgcaaaac 43920
cactgaagca tgaaggaaat ggtgagttta gggaaaatga agagaagatg gctgtgactg 43980
aagcacagga tttgggattg gagaaggac tggaggtag gctgagaaga ggcaaactca 44040
gaaaagatgt tgtgctgggc agtctggaca ttatcttga agcccaccac atataagtca 44100
tagggctact ggaggtttta agctaaaagt gactattcaa tttcaactta agagaagata 44160
ggttgagagg gaacatggct tgagatgagc catgagcaaa ggaaagacta caacaaagcc 44220
aggagtgagg agtgtgtgaa gcaagaaagt gacagttgaa agcagtgagc aggggatgaa 44280
tctgagaggc atctatgagg tggaactcaa atgacatgat aataatacag ggcatttctc 44340
tgtgtcagat gctgtcctaa gtccttactc cattgatctt cacagcaact cagcatagtt 44400
aatattttat gcataaagaa atcggcactt gaaggagtaa ttggccccag attacactgc 44460
ctataaggat tcaaatccag gtttgtttgg ctccaaaaac tggctcctaa ttttcagaag 44520
gagaagcgac ccagggaat gcccaatttt gcttcttagg caatggagga atccacaatc 44580
ggaaggagtt ttcagcagtg cccatttgg ggtgggttga atttgaggtc cctgcatgat 44640
accactttg ctacttcag tgcctaaaac tgagtatggt tcatagtagg tgttcaataa 44700
gtgttgatgc agtgaataca tgcattggga gatatgcac aggcaatggg aaattcaact 44760
ctaaggctta ggggaaagct ggagcttgaa gacagagctt tagaaaacag tagcatagaa 44820
gggagtagga accatgagtt tagacaatac aattcaggaa gaactttgta gcaaggataa 44880
agaggcaaaa aattaaagag gtgagagcta agtgtggtgc ctggggaatc ttaaggtgtg 44940
ggcacgggga ggagatgcca gcaaagaaca tgaataaaaa gcggtagcac agcccctccc 45000
atctggaagc caaaaagaat tgtaaatgga ggaagttagc agaaggatca aatacttgaa 45060
gagggtggaa ttggaataaa accagggcac ttgaaaaatt gggttgtcac tgcaatctta 45120
acaagagaag ttttggcagg atgatggagg cagaaagctg agagaatcat cagttagaac 45180
gtttttgact tcagagaaca gaaaatgcag ttcataatgg ctttaaaaca ggggcttggt 45240

tttctcccag caatttgaga ggccaaggcg ggtgcatcag gaggtcaaga gaccgagacc 45300
atcctggcca acatggtgaa tccccatctc tactaaaaat acaaaaatta gcggggcatg 45360
gtggtgcacg cctatagtcc catctactca ggaggctgag gcaggagaat cacttgaacc 45420
caggaggtgg aggttgcagt gagctgagat catggccact gcactatagc ctggagacac 45480
agcgagactc cgtctccaaa aaaaaaaaaa aagaaggcag aaggtgaata gttcaagggt 45540
gggttttagga ctcaagtata ataggattct gcctggcttc tcatggttct ctaggtcttc 45600
cattcatggc accatgccct cactaggcat gctgccagag caggaggggc aggtggaggg 45660
ttctcttgtg tctgtcttat cagggaagaa gagctttctc agaagcccc agcagactcc 45720
cttttcatat tatggtccag caatgagtca cagacctatg caccacctgc aaaggagcca 45780
gagaaaacaa acgcccagcg cttttagcct gaaaatgaga atctggtttg ctggggaaga 45840
taaagggtgt cggaaaatgg ctgttgggta aatcattgat gtctgccact aggaatgaaa 45900
ggcaaatcag gaactggcac acatgcttcc agggagatgg ctgcaaggga gagggcaaag 45960
actgggaagt tgcttatgtg gtgccagact atttggaaga tcatggattg cgggtgtttgt 46020
gttgtgtggt catcattttg ttctttgttt acagaacaga gaaagtggat tgaacaagga 46080
cgcatttccc cagtacatcc acaacatgct gtccacatct cgttctcggg ttatcagaaa 46140
taccaacgag agcgggtgaag aagtcaccac cttttttgat tatgattacg gtgctccctg 46200
tcataaattt gacgtgaagc aaattggggc ccaactcctg cctccgctct actcgctggt 46260
gttcatcttt ggttttgtgg gcaacatgct ggctgtcctc atcttaataa actgcaaaaa 46320
gctgaagtgc ttgactgaca ttacctgct caacctggcc atctctgac tgctttttct 46380
tattactctc ccattgtggg ctactctgc tgcaaatgag tgggtctttg ggaatgcaat 46440
gtgcaaatta ttcacagggc tgtatcacat cggttatttt ggcggaatct tcttcatcat 46500
cctcctgaca atcgatagat acctggctat tgtccatgct gtgtttgctt taaaagccag 46560
gacggtcacc tttgggggtg tgacaagtgt gatcacctgg ttggtggctg tgtttgcttc 46620
tgtcccagga atcatcttta ctaaagcca gaaagaagat tctgtttatg tctgtggccc 46680
ttattttcca cgaggatgga ataatttcca cacaataatg aggaacattt tggggctggt 46740
cctgccgctg ctcatcatgg tcatctgcta ctcggaatc ctgaaaacc tgcttcggtg 46800
tcgaaacgag aagaagaggc atagggcagt gagagtcac ttcacatca tgattgttta 46860
ctttctcttc tggactccct ataacattgt cattctcctg aacaccttc aggaattctt 46920
cggcctgagt aactgtgaaa gcaccagtca actggacca gccacgcagg tgacagagac 46980

tcttgggatg actcactgct gcatcaatcc catcatctat gccttcgttg gggagaagtt 47040
cagaaggtat ctctcggtgt tcttccgaaa gcacatcacc aagcgcttct gcaaacaatg 47100
tccagttttc tacagggaga cagtggatgg agtgacttca acaaacacgc cttccactgg 47160
ggagcaggaa gtctcggtcg gtttataaaa cgaggagcag tttgattggt gtttataaag 47220
ggagataaca atctgtatat aacaacaaac ttcaagggtt tgttgaacaa tagaaacctg 47280
taaagcaggt gccaggaac ctgagggtcg tgtgtactaa tacagactat gtcaccaat 47340
gcatatccaa catgtgctca gggaataatc cagaaaaact gtgggtagag actttgactc 47400
tccagaaagc tccttcagc tcctgaaaaa tgcctcatta ccttgtgcta atcctctttt 47460
tctagtcttc ataatttctt cactcaatct ctgattctgt caatgtcttg aaatcaaggg 47520
ccagctggag gtgaagaaga gaatgtgaca ggcacagatg aatgggagtg agggatagtg 47580
gggtcagggc tgagaggaga aggagggaga catgagcatg gctgagcctg gacaaagaca 47640
aaggtgagca aagggtcac gcattcagcc aggagatgat actggtcctt agccccatct 47700
gccacgtgta tttaaccttg aagggttcac caggtcaggg agagtttggg aactgcaata 47760
acctgggagt tttggtggag tccgatgatt ctcttttgca taagtgcag acatattttt 47820
gctttattac agtttatcta tggcacccat gcaccttaca ttgaaatct atgaaatata 47880
atgctccatt gttcagatgc ttcttaggcc acatccccct gtctaaaaat tcagaaaatt 47940
tttgtttata aaagatgcat tatctatgat atgctaatat atgtatatgc aatatatata 48000
ggctcttgct tgatctctcc aggaggtagt gattatgaga aggggggtgga gaatgatgag 48060
ttccttcacc aggagcaaag gacggggatc gtgtggaacc actgcagaac tatttccgga 48120
atcaactaag tggagagagc caggaaggct gcatcagaac ccagtaaagc ttcttgtctg 48180
gatctgagct ggtttgtttt gtgcttgctt ttcctgcct tgccactccc ctactcttc 48240
tcttttccc acagcctttt tcacatagct cttggctgta ggattgcccc actccaaaaa 48300
ccagtgtgtg gaggtccagg agtgagacca ggaaagaatg tgaaagtgc tacacaagga 48360
ctcctcgatg gtcgtggaaa aggaaagtca attggcagag cccctgaagc cagtcttcag 48420
gacaaagaag gagcctagag acagaaatga cagatctctg ctttggaat cacacgtctg 48480
gcttcacaga tgtgtgattc acagtgtgaa tcttgggtgc tacgttacca ggcaggaagg 48540
ctgagaggag agagactcca gctgggttgg aaaacagtat tttccaaact accttcag 48600
tcctcathtt tgaatacagg catagagttc agactttttt taaatagtaa aaataaaatt 48660
aaagctgaaa actgcaactt gtaaagtgtg taaagagtta gtttgagtta ctatcatgtc 48720

aaacgtgaaa atgctgtatt agtcacagag ataattctag ctttgagctt aagaattttg 48780
agcaggtggt atgtttggga gactgctgag tcaacccaat agttgttgat tggcaggagt 48840
tggaagtgtg tgatctgtgg gcacattagc ctatgtgcat gcagcatcta agtaatgatg 48900
tcgtttgaat cacagtatac gctccatcgc tgtcatctca gctggatctc cattctctca 48960
ggcttgctgc caaaagcctt ttgtgttttg ttttztatca ttatgaagtc atgcgtttta 49020
tcacattcga gtgtttcagt gcttcgcaga tgtccttgat gctcatattg ttcctatatt 49080
tgccagtggg aactcctaaa tcaaattggc ttctaataca agctttttaa ccctattggg 49140
aaagaatgga aggtggagaa gctccctgaa gtaagcaaag actttcctct tagtcgagcc 49200
aagttaagaa tgttcttatg ttgccagtg tgtttctgat ctgatgcaag caagaaacac 49260
tgggcttcta gaaccaggca acttgggaac tagactccca agctggacta tggctctact 49320
ttcaggccac atggctaaag aaggtttcag aaagaagtgg ggacagagca gaactttcac 49380
cttcatatat ttgtatgata ctaatgaatg cataaaatgt taagttgatg gtgatgaaat 49440
gtaaatactg tttttaacaa ctatgatttg gaaaataaat caatgctata actatgttga 49500
taaaagattt aaaaacaact ggctgttttt ttacactgtg gtgtggaaga ttgtgttgtg 49560
ttcacaactt ttcacttctt cccctgtgtg attacacaca cctgcccttg tgggtgtgact 49620
tgcagtgcgc cctacaggcc acacaacccc atgccctcca ccaactggctc tgctgctgga 49680
atgtgagcag aagtgacatc tgcctcatcc aagcagagcc tcttgctcag ccacaggaag 49740
gccattcca gatcacaccc gtcagcccgt gcgccctggg gaatgagaag acacaggag 49800
ctgcagccac atataacatg agcaagaagt ctgtgtttgc tgtgataagc cactgagttt 49860
taggggttgt ttgttaagaa gcacaaaaac cgattaagac atgtggtata tagtgacttc 49920
atatatagaa tctggaaaac tatccattta ttttcaatca tggaattcaa tatgacaagc 49980
atcccggagg gtctacctat 50000

<210> 3

<211> 6065

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ctggcgggac agcagcgtgg actcagtcct ctagggattt cccaactctc ccgcccgtt 60

gctgcatctg gacaccctgc ctcaggccct catctccact ggtcagcagg tgacctttgc 120
ccagcgccct gggctctcag tgcctgctgc cctggagatg atataaaaca ggtcagaacc 180
ctctctgctg tctgctcagt tcatccctag aggcagctgc tccaggtaat gccctctggg 240
gaggggaaag aggaggggag gaggatgaag aggggcaaga ggagctccct gccagccca 300
gccagcaagc ctggagaagc acttgctaga gctaaggaag cctcggagct ggacgggtgc 360
ccccacccc tcatcataac ctgaagaaca tggaggcccg ggaggtgtca cttgccccaa 420
gctacatagg ggggtgggct ggaagtggct ccaagtgcag gttccccct cattcttcag 480
gcttagggct ggaggaagcc ttagacagcc cagtcctacc ccagacaggg aaactgaggc 540
ctggaagagg gccagaaatc acccaaagac acacagcatg ttggctggac tggacggaga 600
tcagtccaga ccgcagtgcc ttgatgttca gtctggtggg tttctgctc catcccacc 660
acctccttg ggcctcgatc cctcgccgct caccagtccc cttctgaga gcccgatga 720
gcaggagccg gccctactc cttctggcag acccagctaa ggttctacct taggggccac 780
gccacctccc caggagggg tccagaggca tggggacctg gggtgcccct cacaggacac 840
ttccttgcat gaacagaggt gccatgcagc cccgggtact ccttgttgtt gccctcctgg 900
cgctcctggc ctctgcccgt aagcacttgg tgggactggg ctgggggcag ggtggaggca 960
acttggggat ccagtccaa tgggtggtca agcaggagcc ccagggctcg tccagaggcc 1020
gatccacccc actcagccct gctctttcct caggagcttc agaggccgag gatgcctccc 1080
ttctcagctt catgcagggc tacatgaagc acgccacca gaccgccaag gatgcactga 1140
gcagcgtgca ggagtcccag gtggcccagc aggccaggta caccgctgg cctccctccc 1200
catccccct gccagctgcc tccattccca cccgcccctg ccctggtgag atcccaaca 1260
tggaatggag gtgctccagc ctcccctggg cctgtgctct tcagcctcct ctttcctcac 1320
agggcctttg tcaggctgct gcgggagaga tgacagagtt gagactgcat tcctcccagg 1380
tccctccttt ctcccggagc agtcctaggg ccgcgccgtt ttagccctca tttccatttt 1440
cctttccttt ccctttcttt ctctttctat tttctttct tttttcttt ctttctttct 1500
ttctttcttt ctttctttct ttctttcttt tctttccttt ctttctttct tttctttctt 1560
tctttttctt tctttctttc cttttcttt ctttcctct cttcctttct ctctttcttt 1620
ctttcttttt tttttttaat ggagtctccc tctgtcacc aggctggagt gcagtgggtgc 1680
catctgggct cactgcaacc tccgtctccc gggttcaacc cattctcctg cctcagcctc 1740
ccaagtagct gggattacag gcacgcgcca ccacaccag ctaatttttg tatttttagc 1800

agagatgggg tttcaccatg ttggccaggt tggctttgaa ttcctgacct caggggatcc 1860
tcctgcctcg gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcacg agccactgcg cctggcccca 1920
ttttcctttt ctgaaggtct ggctagagca gtggctctca gccttttttg caccagggac 1980
cagttttgtg gtggacaatt tttccatggg ccagcgggga tggttttggg atgaagctgt 2040
tccacctcag atcatcaggc attagattct cataaggagc cctccaccta gatccctggc 2100
atgtgcagtt cacaataggg ttcacactcc tatgagaatg taaggccact tgatctgaca 2160
ggaggcggag ctgaggcgta ttgctcactc acccaccact cacttcgtgc tgtgcagccc 2220
ggctcctaac agtccatgga ccagtaccta tctatgactt gggggttggg gaccctgggc 2280
taggggtttg ccttgggagg cccacctga cccaattcaa gcccgtgagt gcttctgctt 2340
tgttctaaga cctggggcca gtgtgagcag aagtgtgtcc ttcctctccc atcctgcccc 2400
tgcccatcag tactctcctc tcccctactc ctttctccac ctccacctga ctggcattag 2460
ctggcatagc agaggtgttc ataaacattc ttagtcccca gaaccggctt tggggtaggt 2520
gttattttct cactttgcag atgagaaaat tgaggctcag agcgattagg tgacctgcc 2580
cagatcacac aactaatcaa tctccaatg actttccaaa tgagaggctg cctccctctg 2640
tctaccctg ctgagagcca ccaggttgtg caactccagg tgggtgtgtt tgcacagaaa 2700
acaatgacag ccttgacctt tcacatctcc ccacctgtc actttgtgcc tcaggcccag 2760
gggcataaac atctgaggtg acctggagat ggcagggttt gacttgtgct ggggttctctg 2820
caaggatata tcttctccca ggggtggcagc tgtgggggat tcctgcctga ggtctcaggg 2880
ctgtcgtcca gtgaagttga gaggggtgtg tggctctgac tgggtgtcgtc cagtggggac 2940
atgggtgtgg gtcccatggt tgcctacaga ggagttctca tgccctgctc tgttgcttcc 3000
cctgactgat ttaggggctg ggtgaccgat ggcttcagtt ccctgaaaga ctactggagc 3060
accgttaagg acaagttctc tgagttctgg gatttgacc ctgaggtcag accaacttca 3120
gccgtggctg cctgagacct caatacccca agtccacctg cctatccatc ctgccagctc 3180
cttgggtcct gcaatctcca gggcttcccc ttaggttgc ttaaaaggga cagtattctc 3240
agtgtctctc taccacact catgcctggc cccctccag gcatgctggc ctcccaataa 3300
agctggacaa gaagctgcta tgagtgggcc gtcgcaagtg tgccatctgt gtctgggcat 3360
gggaaagggc cgaggctgtt ctgtgggtgg gactggaca gactccaggt caggcaggca 3420
tggaggccag cgctctatcc acctctggt agctgggcta gtctctgggc ctgagtttct 3480
tcattcttaa ggtaggaatc accctccgta cctgccttc ctgacagct ttgtgcggaa 3540

gggtcaaacag gacaataagt ttgctgatac tttgataaac tgttaggtgc tgcacaacat 3600
gacttgagtg tgtgccccat gccagccact atgcctggca ctttaagtgtc atcagagttg 3660
agactgtgtg tgtttactca aaactgtgga gctgacctcc cctatccagg ccacctagcc 3720
ctcttaggcg cacgtgaagg gaggaggccg gatgggctag aggttggagt aagatgcaac 3780
gaggcactat tcttggctcc accacttgat atcagcctca gtttcttaca tgtaaagtgg 3840
atacaaccgt accccctcca ccgtaggttt gccgtgagat tgaaatgaga gagcgttcga 3900
accgtttggc acagcacctg cacgtaaaga tgcttgatca atgttgtcat gattacagtt 3960
gagctgactg ggcccttggg accggactgg agtgggtggg ggcagtgtcc tgggacacaa 4020
aagaagcaca aggtctccca atagaggctg cttcctttgt gtccccacca cccgaaagat 4080
gtcaggtcag agagcccgag agctgcagat ggcttgagta gggctccact cttcagatca 4140
aaaaactgtg gcccgagag gcgaaggcac ttggccagca tcacagagcc agcacgtggc 4200
agggccagac cttgagccca ggtcagctgc gtgtattctg ctcagttggt gcagaaaaca 4260
gttttgtcac tcctatgtca ggtgttaggg actcctttac agatctcagt ggcatcagta 4320
catccagccc cacctggaga ctgctttctc tctgaaaatt ccccagggt tctctctggg 4380
ctgagagatc tcagcaccgg tatctagaaa atgttccac ccagacctgg ctggatgact 4440
gctgtttag ctctggaagg ttaggaacta aaaagccac tcctttacct agggtagcta 4500
agatacactg gagatgggga catggggatg gggccgatta tccaggggcc tgcattgagg 4560
ggcaaaaggc cctgcagaga gagggtaggg aaggcactgc cagatctgtg aagccatgtg 4620
cgtgcagcgg ggacattcag acatgagtgc aaggaggac cgtgagcagg gaggtcatgt 4680
gagaatacac aggcattgct gcacacccat gtgaacttga gtgccaggcc acacactctt 4740
ttttttttt ttttttttt tagctggagt cttgctcgt cgcccaggct ggagtgcagt 4800
ggcatgattt cggctcactg tgacctctgc ctcccagggt caagcgattc tcctgcctca 4860
gccttcctag tagctgggat tacgggtgca agccaccatg ccagctgatt tttttttgt 4920
attttttagta gagacagggt ttcacatat tggccaggct ggtctcaaac tcctggccct 4980
gaagtgatac gcccacctca gcctccaaa gtgctgggat tacaggcttg agccaccgca 5040
cccgaccgc acactctttt caataatcat ggatggccag ggggtgcagg tctaaaaagc 5100
gctgcctagc ccatctgct gttcactggg caagcgacgt cacaggcca ggcttcagt 5160
tcctcatcca tgctctgct ctgatggcaa tctagccagg atgtggggaa gggaggatgc 5220
agtgagagca cagatatgag agcatcttg aaataaaaat gtacctgcaa gaggtggtg 5280

tgaattttct tactcaggcc agcttctgcc agggctggca gaaagagggg gtggcatggc 5340
atggagccgc agggggtgga ggactggctt ccactgctgt gcctgaggaa gccgcggctg 5400
tttctgggcg ggatgggagt agtgggaggg ggatactggc cttgtgagaa gaaaagggaa 5460
gtgtctgttt gagaggtttt tgaattagta aaggaggaca ggcgcaaact ccaagcgctt 5520
cacttgcacc cgggacaaaa cccaatccc agtggctggc tccctgaggc gccccgctcc 5580
gtcccggccg ctgacagcgg ctgggctgga gaaggctcta tacggacaca cctctgggga 5640
cggggaaccc gactgctccc agctaaagca accgctgttt cctggccccg ctgagacagg 5700
ctgcaggcct tgtttgagcc ctttctaggg cacctggcct tggattgtct gtggctttgc 5760
ctngtccgct gtgacttcct ttctacttga gccttgctaa ggcagactct actccctcac 5820
tcgtaagcag ccangcgtcc agcaggctcct ccaacgtcga tcttggccct aagacgtcca 5880
gtctgggcac ggagtgtgtg agatccggca ggaagtccct gctccagggc caaaggcccc 5940
tcccgggctc ccccggatgt cccgcaccc ccctctattc tccaaaaga aagaagctgc 6000
ttcccacttt ggaaacgttt attctgagca ccgggaaggg gggcggcggc gggcgctca 6060
ctggg 6065

<210> 4

<211> 1523

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gggtcgatgg gggagatgga gcaactgcgt caggaagcgg agcagctcaa gaagcagatt 60
gcagatgcca ggaaagcctg tgctgacgtt actctggcag agctggtgtc tggcctagag 120
gtggtgggac gagtccagat gcggacgcgg cggacgttaa ggggacacct ggccaagatt 180
tacgcatgc actgggccac tgattctaag ctgctggtaa gtgcctcgca agatgggaag 240
ctgatcgtgt gggacagcta caccaccaac aagggtcacg ccatcccact gcgctcctcc 300
tgggtcatga cctgtgccta tgcccatca gggaaactttg tggcatgtgg ggggctggac 360
aacatgtgtt ccatctacaa cctcaaatcc cgtgagggca atgtcaaggt cagccgggag 420
ctttctgctc acacaggtta tctctcctgc tgccgcttcc tggatgacaa caatattgtg 480
accagctcgg gggacaccac gtgtgccttg tgggacattg agactgggca gcagaagact 540

gtatttgtgg gacacacggg tgactgcatg agcctggctg tgtctcctga cttcaatctc 600
ttcatttcgg gggcctgtga tgccagtgcc aagctctggg atgtgcgaga ggggacctgc 660
cgtcagactt tctactggcca cgagtcggac atcaacgcca tctgtttctt cccaatgga 720
gaggccatct gcacgggctc ggatgacgct tcctgccgct tgtttgacct gcgggcagac 780
caggagctga tctgcttctc ccacgagagc atcatctgcg gcatcacgtc cgtggccttc 840
tcctcagtg gccgcctact attcgtggc tacgacgact tcaactgcaa tgtctgggac 900
tccatgaagt ctgagcgtgt gggcatcctc tctggccacg ataacagggt gagctgcctg 960
ggagtcacag ctgacgggat ggctgtggcc acaggttcct gggacagctt cctcaaaatc 1020
tggaactgag gaggctggag aaagggaagt ggaaggcagt gaacacactc agcagcccc 1080
tgcccgacct catctattc aggtgttctc ttctatattc cgggtgccat tccactaag 1140
ctttctcctt tgagggcagt ggggagcatg ggactgtgcc tttgggaggc agcatcaggg 1200
acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tcctcccca cagtcctcac 1260
agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gcccctccc agccctttgc aggcccagca 1320
gacttgagtc tgaggcccca ggccctagga ttctccccc agagccacta cctttgtcca 1380
ggcctgggtg gtatagggcg tttggccctg tgactatggc tctggcacca ctagggtcct 1440
ggcctcttc ttattcatgc tttctcctt ttctacctt tttctctcc taagacacct 1500
gcaataaagt gtagcacct ggt 1523

<210> 5

<211> 1178

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggggaagcaa aggagaagct gagaagatga aggaaaagtc agggctctgga ggggcggggg 60
tcaggagact cctgggagat atggccacat gtagcggctc tgaggaatgg gttacaggag 120
acctctgggg agatgtgacc acagcaatgg gtaggagaat gtccagggt atggaagtgc 180
agtatcgggg accccccctt aacgaagaca gggccatgta gagggcccca gggagtgaaa 240
gagcctccag gacctccagg tatggaatac aggggacgtt taagaagata tggccacaca 300
ctggggccct gagaagtgag agcttcatga aaaaaatcag ggacccaga gttccttgga 360

agccaagact gaaaccagca ttatgagtct ccgggtcaga atgaaagaag aaggcctgcc 420
ccagtggctt gtgaattccc gggggtgatt tcactccccg ggctgtccca ggcttgtccc 480
tgctaccccc acccagcctt tcttgaggcc tcaagctgcc accaagcccc cagctccttc 540
tccccgcaga cccaaacaca ggcctcagga ctcaacacag cttttccctc caaccccggtt 600
ttctctccct caaggactca gctttctgaa gcccctccca gttctagttc tatctttttc 660
ctgcatcctg tctggaagtt agaaggaaac agaccacaga cctgggtcccc aaaagaaatg 720
gaggcaatag gttttgaggg gcatggggac ggggttcagc ctccagggtc ctacacacaa 780
atcagtcagt ggcccagaag acccccctcg gaatcggagc agggaggatg gggagtgtga 840
ggggtatcct tgatgcttgt gtgtcccaa ctttccaaat ncccgcccc gcgatggaga 900
agaaaccgag acagaaggtg cagggcccac taccgcttcc tccagatgag cttatgggtt 960
tctccaccaa ggaagttttc cgctggttga atgattcttt ccccgccctc ctctcgcccc 1020
agggacatat aaaggcagtt gttggcacac ccagccagca gacgctccct cagcaaggac 1080
agcagaggac cagctaagag ggagagaagc aactgcagac cccccctgaa aacaaccctc 1140
agacgccaca tcccctgaca agctgccagg caggttct 1178

<210> 6

<211> 6152

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

tggtatttgg gcggctggtg gcggcgggga ctgttgagg gtgggaggag gcgaaggagg 60
agggagaacc ccgtgcaacg ttgggacttg gcaaccgcc tccccctgcc caaggatatt 120
taatttgctt cggaatcgc tgcttcaga ggggaactca ggagggaagg gggcgcgcg 180
tcttgagggg gcaccgagg gacccccgac tgcgcctcc ctgtgccgga ctccagccgg 240
ggcgacgaga gatgcatctt cgctccttcc tgggtggcggc ggcggctgag aggagacttg 300
gctctcgagg gatcggggct gccctcacc cggacgcact gcctccccgc cgggcgtgaa 360
gcgcccga aa actccggctg ggctctctcc tgggctcagc agctgcgtcc tccttcagct 420
gccccctccc gcgcgggggg cggcgtggat ttacagatcg gggtttctgc tgcctccagc 480
cctgtttgca tgtgccgggc gcggcgagg agcctccgcc cccacccgg ttgttttctg 540

gagcctccct ctgctcagcg ttggtggtgg cgggtggcagc atggcgagcc ctccggagag 600
cgatggcttc tgggacgtgc gcaaggtggg ctacctgcgc aaacccaaga gcatgcacaa 660
acgctttctt gtactgcgcg cggccagcga ggctgggggc cggcgcgcc tcgagtacta 720
cgagaacgag aagaagtggc ggcacaagtc gagcgcccc aaacgctcga tcccccttga 780
gagctgcttc aacatcaaca agcgggctga ctccaagaac aagcacctgg tggctctcta 840
caccggggac gagcactttg ccatcgcggc ggacagcgag gccgagcaag acagctggta 900
ccaggctctc ctacagctgc acaaccgtgc taagggccac cacgacggag ctgcggccct 960
cggggcgggg ggtggtggtg ggggcagctg cagcggcagc tccggccttg gtgaggctgg 1020
ggaggacttg agctacggtg acgtgcccc aggaccgca ttcaaagagg tctggcaagt 1080
gatcctgaag cccaagggcc tgggtcagac aaagaacctg attggtatct accgcctttg 1140
cctgaccagc aagaccatca gcttcgtgaa gctgaactcg gaggcagcgg ccgtggtgct 1200
gcagctgatg aacatcaggc gctgtggcca ctcgaaaac ttctttctca tcgaggtggg 1260
ccgtttctgcc gtgacggggc cgggggagtt ctggatgcag gtggatgact ctgtggtggc 1320
ccagaacatg cacgagacca tcctggaggc catgcgggcc atgagcgatg agttccgccc 1380
tcgcagcaag agccagtcct cgtccaactg ctctaacccc atcagcgctc ccctgcgccc 1440
gcaccatctc aacaatcccc cgcccagcca ggtggggctg acccgccgat cacgactga 1500
gagcatcacc gccacctccc cggccagcat ggtgggcggg aagccaggct ccttccgtgt 1560
ccgcgcctcc agtgacggcg aaggcaccat gtcccgcca gcctcggtgg acggcagccc 1620
tgtgagtccc agcaccaaca gaaccacgc ccaccggcat cggggcaggg cccggctgca 1680
cccccgctc aaccacagcc gctccatccc catgccggt tccgctgct cccgttcggc 1740
caccagcccg gtcagtctgt cgtccagtag caccagtggc catggctcca cctcggtttg 1800
tctcttccca cggcgatcta gtgcttcggt gtctggttcc cccagcgatg gcggtttcat 1860
ctcctcgat gagtatggct ccagtccctg cgatttccgg agttccttcc gcagtgtcac 1920
tccgattcc ctgggccaca cccaccagc ccgcggtgag gaggagctaa gcaactatat 1980
ctgcatgggt ggcaaggggc cctccaccct gaccgcccc aacggtcact acattttgtc 2040
tcgggggtggc aatggccacc gctgcacccc aggaacaggc ttgggcacga gtccagcctt 2100
ggctggggat gaagcagcca gtgctgcaga tctggataat cggttccgaa agagaactca 2160
ctcggcaggc acatccccta ccattacca ccagaagacc ccgtcccagt cctcagtggc 2220
ttccattgag gagtacacag agatgatgcc tgcctacca ccaggaggtg gcagtggagg 2280

ccgactgccg ggacacaggc actccgcctt cgtgcccacc cgctcctacc cagaggaggg 2340
tctggaaatg cacccttgg agcgtcgggg ggggcaccac cgcccagaca gtcaccct 2400
ccacacggat gatggctaca tgcccatgtc cccaggggtg gccccagtgc ccagtggccg 2460
aaagggcagt ggagactata tgcccatgag cccaagagc gtatctgccc cacagcagat 2520
catcaatccc atcagacgcc atcccagag agtggacccc aatggctaca tgatgatgtc 2580
ccccagcggg ggctgtcttc ctgacattgg aggtggcccc agcagcagca gcagcagcag 2640
caacgccgtc ccttcggga ccagctatgg aaagctgtgg aaaaacgggg tagggggcca 2700
ccactctcat gtcttgcttc acccaaacc cccagtggag agcagcgggtg gtaagctctt 2760
accttgaca ggtgactaca tgaacatgtc accagtgggg gactccaaca ccagcagccc 2820
ctccgactgc tactacggcc ctgaggaccc ccagcacaag ccagtcctct cctactactc 2880
attgccaaga tcctttaagc acaccagcg ccccggggag ccggaggagg gtgcccggca 2940
tcagcacctc cgcctttcca ctagctctgg tcgccttctc tatgtgcaa cagcagatga 3000
ttcttctct tccaccagca gcgacagcct ggggtggggga tactgcgggg ctaggctgga 3060
gcccagcctt ccacatcccc accatcaggt tctgcagccc catctgcctc gaaaggtgga 3120
cacagctgct cagaccaata gccgcctggc ccggcccacg aggctgtccc tgggggatcc 3180
caaggccagc accttacctc gggcccgaga gcagcagcag cagcagcagc ccttgctgca 3240
ccctccagag cccaagagcc cgggggaata tgtcaatatt gaatttgga gtgatcagtc 3300
tggtacttg tctggcccgg tggctttcca cagctcacct tctgtcaggt gtccatcca 3360
gctccagcca gctcccagag aggaagagac tggcactgag gactacatga agatggacct 3420
ggggccgggc cggagggcag cctggcagga gagcactggg gtcgagatgg gcagactggg 3480
ccctgcacct cccggggctg ctagcatttg caggcctacc cgggcagtgc ccagcagccg 3540
gggtgactac atgacatgc agatgagttg tccccgtcag agctacgtgg acacctgcc 3600
agctgccct gtaagctatg ctgacatgcg aacaggcatt gctgcagagg aggtgagcct 3660
gcccagggcc accatggctg ctgcctctc atcctcagca gcctctgctt cccgactgg 3720
gcctcaagg gcagcagagc tggctgcca ctcgtccctg ctggggggcc cacaaggacc 3780
tgggggcatg agcgccttca cccgggtgaa cctcagtcct aaccgcaacc agagtgccaa 3840
agtgatccgt gcagaccac aagggtgccg gcggaggcat agctccgaga ctttctctc 3900
aacaccagt gccaccggg tgggcaacac agtgccctt ggagcggggg cagcagtagg 3960
gggcgggtggc ggtagcagca gcagcagcga ggatgtgaaa cgccacagct ctgcttcctt 4020

tgagaatgtg tggctgaggc ctggggagct tgggggagcc cccaaggagc cagccaaact 4080
gtgtggggct gctgggggtt tggagaatgg tcttaactac atagacctgg atttgggtcaa 4140
ggacttcaaa cagtgccttc aggagtgcac ccctgaaccg cagcctcccc cacccccacc 4200
ccctcatcaa cccctgggca gcggtgagag cagctccacc cgccgctcaa gtgaggattt 4260
aagcgcctat gccagcatca gtttccagaa gcagccagag gaccgtcagt agctcaactg 4320
gacatcacag caggtcgttt catggtgaca aagtcagaag acaaaactgc ttttaacctt 4380
gtccttgaat tctgttcttc gcctctgccc cttcctgttc tttccactg cttcctcagg 4440
gagaatgcac ttacattctc agggcataca agatgctcac ccacactgac attggcagag 4500
agtcaaaca acatgtagga gcagccacag gagggctttt tcgtttgagg aattcccaag 4560
tgaagtagtt actgcagtat ttttaacat atatcctatg ccagttctgc gttttgtaga 4620
gttcctccgt aagaagcttg atttgtttgt tgaagtttc ttttactat atatttaggt 4680
cagcccctgg aaggacagtt ctacaaaaa taccgtaa cacaggggct aaacccttcc 4740
ttatcttaaa ctatcttaat agtttctggg agcccttaag ggtgatctta tcaagttgtt 4800
ctctgtactt ttgttctgtg atttcataat actagggcaa cataaacagc agcgggaagc 4860
attgatttct attcatcctg ccctaaaaag atcaggagta agagcttttt agaaatatgt 4920
atttagagag aagtacctat ctattttgtg atctctcaag aaagtaatta tgggtgacgt 4980
tctccttttg ttcattgtacc aggatttgtg aaatattatt cacacaaccg acccaccatc 5040
ccacgggcct ggcctctctt gtacaggata tgcaggaaac tctgtatgtg tctgggaccc 5100
attattaaga gttatgggag ttcattcctag gatgtctgcc ttatagttat ctcttcttct 5160
tgcactgaga cattacagat atcatttggg ggctactata tatcttctgt aaaattactt 5220
ttatttgttg aagaagaatg catactaagt caggaacatg ccttaatttg ttttgttttg 5280
caattgagta gaagggctaa actgtatccc tccactttta gggttatttg cctgtgtgcc 5340
tttaagttca aaagtagaca ccacagtaaa tgctgaaagt tggctttagg tcttctgtgg 5400
ctaagccgt attaaaaatg aaaaacattt gtggtagaaa ttagcctgcc cttcgttctg 5460
ttgatcctgt tttctgggtg tcataattgt gggtagaaga gagtacagtt tgcaaataat 5520
gtgatgagtt ggcaatgcag aagtttccag catttggaaa cactttactc tgacaaactg 5580
attatcttgt gaattttatc tatgctccac agaagtagct tttaaaagca ctgatttttc 5640
ttaatttgtg tccattcata agaaattaat ctgtgcccctg gtttcctatt gacaggtatt 5700
tatttatcat gtgttcatag tcttcttaat tctgtttcca atatttgatc catataattc 5760

tctatatttat aaagcaagaa aaaggtatat gaacactcaa atgaagattt tgggtgatat 5820
gttacaaaaa gcatttatatt gatcagtatt tacttcaaca tttatatttca tcattcacta 5880
gaagaaagat ttaatttgtgt atatcaacat cagtagtaca aatcttgtta tatcaaatga 5940
tgtttttggg agttcagaat ccctcaacac ttttaagcatt tgtattataa agtgcctcat 6000
tggtaaaata atgagaattt gaagaaaacc agcccagcag aactaaaatt ttggtttttaa 6060
aggagataaa gagaataagt ttttcttact tgtcatctta atttgtttag gtttcttttt 6120
atagagtaga ataaatgatg tttgctctga ag 6152

<210> 7

<211> 2480

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gacgctctgt gccttcggag gtctttctgc ctgcctgtcc tcatgcctct cctcctcttg 60
ctgctcctgc tgccaagccc cttacacccc caccctatct gtgaggcttc caaagtggcc 120
agccacctag aagtgaactg tgacaagagg aatctgacag cgctgcctcc agacctgccg 180
aaagacacaa ccctcctcca cctgagtgag aacctcctgt acaccttctc cctggcaacc 240
ctgatgcctt acactgcct cactcagctg aacctagata ggtgcgagct caccaagctc 300
caggctgatg ggacgctgcc agtgctgggg accctggatc tatcccacaa tcagctgcaa 360
agcctgccct tgctagggca gacactgcct gctctcaccg tcttgagct ctccttcaac 420
cggctgacct cgctgcctct tgggtgccctg cgtggctcttg gcgaactcca agagctctac 480
ctgaaaggca atgagctgaa gacctgccc ccagggtctc tgacgcccac acccaagctg 540
gagaagctca gtctggctaa caacaacttg actgagctcc ccgctgggct cctgaatggg 600
ctggagaatc tcgacaccct tctcctccaa gagaactcgc tgtatacaat accaaagggc 660
ttttttgggt cccacctcct gccttttgct tttctccacg ggaaccctg gttatgcaac 720
tgtgagatcc tctattttcg tcgctggctg caggacaatg ctgaaaatgt ctacgtatgg 780
aagcaagggtg tggacgtcaa ggccatgacc tctaactggt ccagtggtgca gtgtgacaat 840
tcagacaagt ttccgtctca caaatacca ggaaaggggt gccccaccct tggatgatgaa 900
ggtgacacag acctatatga ttactacca gaagaggaca ctgagggcga taagggtcgt 960

gccacaagga ctgtgggtcaa gttccccacc aaagcccata caaccccctg ggggtctattc 1020
tactcatggt ccaactgcttc tctagacagc caaatgccct cctccttgca tccaacacaa 1080
gaatccacta aggagcagac cacattccca cctagatgga ccccaaattt cacacttcac 1140
atggaatcca tcacattctc caaaactcca aaatccacta ctgaaccaac cccaagcccg 1200
accacctcag agcccgtccc ggagcccgcc ccaaactga ccaccctgga gccactcca 1260
agcccgacca cccagagcc cacctcagag cccgccccca gcccgaccac cccggagccc 1320
acccaatcc cgaccatgc cacaagccc accatcctgg tgtctgccac aagcctgatc 1380
actccaaaaa gcacattttt aactaccaca aaaccgtat cactcttaga atccacaaa 1440
aaaaccatcc ctgaacttga tcagccacca aagctccgtg ggggtgctcca agggcatttg 1500
gagagctcca gaaatgacc ttttctccac cccgactttt gctgcctcct cccctgggc 1560
ttctatgtct tgggtctctt ctggctgctc ttgcctctg tggctctcat cctgctgctg 1620
agctgggttg ggcatgtgaa accacaggcc ctggactctg gccaaaggtgc tgctctgacc 1680
acagccacac aaaccacaca cctggagctg cagaggggac ggcaagtgc agtgccccgg 1740
gcctggctgc tcttccttcg aggttcgctt cccactttcc gctccagcct cttcctgtgg 1800
gtacggccta atggccgtgt ggggcctcta gtggcaggaa ggaggccctc agctctgagt 1860
cagggtcgtg gtcaggacct gctgagcaca gtgagcatta ggtactctgg ccacagcctc 1920
tgagggtggg aggtttgggg accttgagag aagagcctgt gggctctcct attggaatct 1980
agttgggggt tggaggggta aggaacacag ggtgataggg gaggggtctt agttcctttt 2040
tctgtatcag aagccctgtc ttcacaacac aggcacacaa tttcagtccc agccaaagca 2100
gaaggggtaa tgacatggac ttggcggggg gacaagacaa agtcccgat gctgcatggg 2160
gcgctgccag atctcacgt gaaccatttt ggcagaatac agcatggttc ccacatgcat 2220
ttatgcacag aagaaaatct ggaaagtgat ttatcaggat gtgagcactc gttgtgtctg 2280
gatgttaciaa atatgggtgg ttttattttc tttttccctg tttagcattt tctagttttc 2340
ttatcaggat gtgagcactc gttgtgtctg gatgttaciaa atatgggtgg ttttattttc 2400
tttttccctg tttagcattt tctagttttc cactattatt gtatattatc tgtataataa 2460
aaaataattt tagggttggg 2480

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 8

gagtctacct gtttactatc aanaa

25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 9

gagtctacct gtttactatc aanga

25

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 10

accagtacta aagcaaatta aact

24

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 11

gcagtttatt aagatgaggn cg

22

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 12

ttgcagttta ttaagatgag gntg

24

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 13

ggtgctccct gtcataaatt tga

23

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 14

ccttctcagc ttcattgcagg

20

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 15

gtcttggtgg cgtgcttca

19

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 16

tctgcggcat cacgtncg

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 17

tctgcggcat cacgtntg

18

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 18

gaatagtagg cggccactga

20

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 19

tctacatggc cctgtcttng t

21

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 20

ctctacatgg ccctgtcttn at

22

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 21

ctctacatgg ccctgtcttt at

22

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 22

ccccatcctc cctgctnccg

19

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 23

ccccatcctc cctgctntg

19

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 24

agtcagtggc ccagaagacc

20

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 25

gggccctgca cctcnngg

18

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 26

gggccctgca cctcnag

18

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 27

gggtaggcct gcaaattgcta

20

<210> 28

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 28

cccagggtc ctgncg

16

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 29

ccccagggt cctgntg

17

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 30

tgagcttctc cagcttgggt g

21

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<400> 31

cagcttcatg cagggctaca

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<400> 32

cagcttcatg cagggttaca

20

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<400> 33

acatggccct gtcttngtta ag

22

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<400> 34

acatggccct gtcttnatta ag

22

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<400> 35

cacctcngg ggctgctag

19

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<400> 36

cacctcnag ggctgctag

19

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は実施例におけるスクリーニング関連解析において検討した112遺伝子多

型をまとめた表である。

【図 2】

図 2 は同じく実施例におけるスクリーニング関連解析において検討した112遺伝子多型をまとめた表である。

【図 3】

図 3 は実施例において遺伝子型を決定するために使用されるプライマー（上から順に配列番号 16、17、18、14、15、11、12、13、8、9、10、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30）及びプローブ（上から順に配列番号 31、32、33、34）及びその他の条件をまとめた表である。図中、FITCはフルオレセインイソチオシアネートを、TxRはテキサスレッドを、Biotinはビオチンをそれぞれ表す。

【図 4】

図 4 は実施例の関連解析において検討した一塩基多型をまとめた表である。

【図 5】

図 5 は実施例における関連解析の対象とした男性1107例及び女性833例の背景データをまとめた表である。年齢、Body mass index、収縮期血圧、拡張期血圧、血清クレアチニンの各データは平均±標準偏差で表される。表中、*1は $P<0.001$ を、*2は $P<0.001$ を、*3は $P<0.01$ をそれぞれ表す。

【図 6】

図 6 は関連解析の対象とした遺伝子多型と多項ロジスティック回帰分析の結果をまとめた表である。各SNPにおいて低い方のP値は太字で表される。

【図 7】

図 7 は高血圧と関連のある遺伝子多型について遺伝子型の分布を示した図である。

【図 8】

図 8 は高血圧と関連のある遺伝子多型における多項ロジスティック回帰分析の step forward selection methodを行った結果を示す表である。

【図 9】

図 9 は男性における4個の組合せ遺伝子多型を用いた高血圧の遺伝的リスク診

断を行った結果を示す表である。

【図 10】

図 10 は女性における4個の組合せ遺伝子多型を用いた高血圧の遺伝的リスク診断を行った結果を示す表である。

【図 11】

図 11 は高血圧のリスク診断における累積オッズ比と一塩基多型の数の関連を表したグラフである。(A) は男性、(B) は女性における関連を示す。(A) における各 SNP は、SNP1:GPIa(1648A→G)多型、SNP2:CCR2(190G→A)多型、SNP3:ApoC-II I(1100C→T)多型、SNP4:GP β 3(825C→T)多型である。(B) における各 SNP は、SNP1:TNF α (-850C→T)多型、SNP2:TNF α (-238G→A)多型、SNP3:IRS-1(3494G→A)多型、SNP4:GPIb α (1018C→T)多型である。

【書類名】

図面

【図 1】

遺伝子	多型	遺伝子	多型
アンギオテンシン変換酵素	I/D in intron 16	インスリン受容体サブストレート 1	3494G→A (Gly972Arg)
アンギオテンシン II タイプ I 受容体	-535C→T	インターロイキン 10	-1082G→A
アンギオテンシンノーゲン	-6G→A		-819T→C
アポリポプロテイン A1	-75G→A		-592A→C
	83C→T	インターロイキン 1α	-889C→T
アポリポプロテイン B	I/D in signal peptide	インターロイキン 1β	-511C→T
アポリポプロテイン C-III	-482C→T		3953C→T
	1100C→T	インターロイキン 6	-634C→G
アポリポプロテイン E	-491A→T		-174G→C
	-219G→T	LDL 受容体関連タンパク質	766C→T
	3932T→C (Cys112Arg)	レプチン	-1887C→A
アポリポプロテイン(a)	4070C→T (Arg158Cys)	リポプロテインリパーゼ	280G→A (Asp9Asn)
	93C→T		1127A→G (Asn291Ser)
	121G→A	マンガンスーパーオキシドジスムターゼ	47C→T (Ala16Val)
ATP-結合カセットトランスポーター-1	11764A→C (Thr12Pro)	マトリックス Gla タンパク質	173T→C (Ile58Thr)
	-477C→T		-7G→A
心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)	1051G→A (Arg219Lys)	メタロプロテナーゼ 1(コラゲナーゼ)	7158A→G (Thr83Ala)
ANP クリアランス受容体	664G→A (Val7Met)	メタロプロテナーゼ 12	-1607G→GG
	-55A→C	(マクロファージ エラスターゼ)	-82A→G
β2-アドレナリンレ受容体	46A→G (Arg16Gly)	メチオニンシンターゼ	2756A→G (Asp919Gly)
	79C→G (Gln27Glu)	メチレンテトラヒドロ葉酸リダクターゼ	677C→T (Ala222Val)
β3-アドレナリン受容体	491C→T (Thr164Ile)	単球ケモカイン誘引タンパク (MCP) 1	-2518G→A
β-フィブリノーゲン	190T→C (Trp64Arg)	NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス	242C→T (His72Tyr)
	-854G→A	ニューロペプチド Y	1128T→C (Leu7Pro)
	-455G→A	パラオキシナーゼ	-107T→C
	148C→T		172A→T (Met55Leu)
CD14 受容体	8059G→A (Arg448Lys)		584G→A (Gln192Arg)
	-260C→T	PECAM1 (CD31)	1454C→G (Leu125Val)

【図 2】

ケモカイン受容体 2	190G→A (Val64Ile)	PECAM1 (CD31)	442G→A (Ser563Asn)
コレステロールエステル輸送タンパク	1061A→G (Ile405Val)	ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体α	696C→G (Leu162Val)
	1163A→G (Asp442Gly)	ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体γ2	34C→G (Pro12Ala)
	1200G→A (Arg451Gln)		344C→A (Pro115Gln)
凝固因子 V	1691G→A (Arg506Gln)	プラスミノゲン活性化因子インヒビター-1	-668/4G→5G
凝固因子 VII	11496G→A (Arg353Glu)	血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ	994G→T (Val279Phe)
凝固因子 XII	46C→T	プロトロンビン	20210G→A
凝固因子 XIII A-サブユニット	163G→T (Val134Leu)	P-セレクチン	76666A→C (Thr715Pro)
コネシン 37	1019C→T (Pro319Ser)	スカベンジャー受容体 BI	4G→A (Gly2Ser)
内皮型一酸化窒素合成酵素	-786T→C		403G→A (Val135Ile)
	894G→T (Glu298Asp)	セロトニン 2A 受容体 r	102T→C
エンドセリン 1	5665G→T (Lys198Asn)	ストロメライシン-1	-1171/5A→6A
E-セレクチン	98G→T	トロンボモジュリン	-33G→A
	561A→C (Ser128Arg)		-10GG→TA
細胞外スーパーオキシジスラムターゼ	1839C→T (Leu554Phe)		845G→A (Ala25Thr)
脂肪酸結合タンパク 2	5775C→G (Arg213Gly)	トロンボポイエチン	2136C→T (Ala455Val)
フラクタルカイン受容体	2445G→A (Ala54Thr)	トロンボスポンジン 1	5713A→G
グリコプロテイン Ia	84635G→A (Val249Ile)	トロンボスポンジン 4	2210A→G (Asn700Ser)
	807C→T	外因系凝固 (組織因子) インヒビター	1186G→C (Ala387Pro)
	873G→A	トランスフォーミング増殖因子β1	874G→A (Val264Met)
	1648A→G (Lys505Glu)		-509C→T
グリコプロテイン Iba	1018C→T (Thr145Met)	腫瘍壊死因子α	869T→C (Leu10Pro)
グリコプロテイン IIIa	1565T→C (Leu33Pro)		-863C→A
グリコプロテイン PC-1	97A→C (Lys121Gln)		-850C→T
G-タンパク質β3 サブユニット	825C→T (splice variant)		-308G→A
ヘモクロマトーシス関連タンパク質	845G→A (Cys282Tyr)		-238G→A
肝性リパーゼ	-480C→T	フォンビルブランド因子	-1234C→T
	-250G→A		-1051G→A

【図 3】

遺伝子	一塩基多型	標識	プライマー	回数	プローブ	ホルミアミド
G-タンパク質β3サブユニット	825C→T	TxR FITC Biotin	TCTGCGGCATCACGTXCG TCTGCGGCATCACGTXIG GAATAGTAGGGGCCACTGA	35		
アポリポプロテイン C-III	1100C→T	Biotin	CCCTCTCAGCTTCATGCAGG GTCCTGGTGGCGTGCTCA	35	CAGCTTCATGCAGGGCTACA CAGCTTCATGCAGGGTTACA	35%
ケモカイン受容体 2	190G→A	Biotin FITC	GCAGTTTATTAAAGATGAGGXCG TTGCAGTTTATTAAAGATGAGGXIG	40		
グリコプロテイン Ia	1648A→G	Biotin FITC	GGTGCTCCCTGTCATAAATTGA GAGTCTACCTGTTTACTATCAAXAA	40		
腫瘍壊死因子α	-850C→T	TxR Biotin	GAGTCTACCTGTTTACTATCAAXGA ACCAGTACTAAAGCAAATTAAACT	40		
腫瘍壊死因子α	-238G→A	Biotin FITC TxR Biotin	TCTACATGGCCCTGCTTXGT CTCTACATGGCCCTGCTTXAT CTCTACATGGCCCTGCTTTAT CCCCATCCTCCCTGCTXCG CCCCATCCTCCCTGCTXIG AGTCAGTGGCCAGAAAGACC GGGCCCTGCACCTCCXAG GGGCCCTGCACCTCCXAG	35 40	ACATGGCCCTGCTCTTXGTTAAG ACATGGCCCTGCTCTTXATTAAAG	30%
インスリン受容体サブストレート 1	3494G→A	Biotin FITC TxR Biotin	GGGTAGGCCCTGCAAAATGCTA CCCAGGGCTCCTGXCG CCCAGGGCTCCTGXIG TGAGCTTCTCCAGCTTGGGTG	40	CACCTCCXAGGGGCTGCTAG CACCTCCXAGGGGCTGCTAG	35%
グリコプロテイン Ibα	1018C→T	Biotin FITC TxR Biotin		40		

【図 4】

遺伝子	多型	遺伝子	多型
男性			
アンギオテンシノーゲン	-6G→A	女性	
アポリipoprotein C-III	-482C→T	アポリipoprotein C-III	-482C→T
アポリipoprotein C-III	1100C→T	アポリipoprotein E	3932T→C
アポリipoprotein E	-219G→T	アポリipoprotein E	4070C→T
アポリipoprotein E	4070C→T	ATP-結合カセットトランスポーター1	1051G→A
ケモカイン受容体2	190G→A	CD14受容体	-260C→T
コネキシン37	1019C→T	コネキシン37	1019C→T
内皮型一酸化窒素合成酵素	-786T→C	E-セレクチン	561A→C
G-タンパク質β3サブユニット	825C→T	内皮型一酸化窒素合成酵素	-786T→C
グリコipoprotein Ia	1648A→G	エンドセリン1	5665G→T
インターロイキン10	-819T→C	脂肪酸結合タンパク2	2445G→A
インターロイキン10	-592A→C	グリコipoprotein Iba	1018C→T
NADH/NADPHオキシダーゼp22フォックス	242C→T	インスリン受容体サブストレート1	3494G→A
血小板活性化因子αセチルヒドロラーゼ	994G→T	インターロイキン6	-634C→G
トロンボモジュリン	2136C→T	パラオキシナーゼ	584G→A
トロンボポイエチン	5713A→G	プラスミノーゲン活性化因子ヒヒター1	-668/4G→5G
トロンボスポンジン4	1186G→C	ストロメライシン-1	-1171/5A→6A
トランスフォーミング増殖因子β1	869T→C	腫瘍壊死因子α	-850C→T
腫瘍壊死因子α	-863C→A	腫瘍壊死因子α	-238G→A

【図 5】

	男性 (n = 1107)		女性 (n = 833)	
	対照 (n = 533)	高血圧例 (n = 574)	対照 (n = 340)	高血圧例 (n = 493)
年齢 (years)	56.3 ± 11.0	59.6 ± 10.1*1	56.8 ± 11.4	62.6 ± 10.5*1
Body mass index (kg/m ²)	23.2 ± 2.7	23.9 ± 2.7*2	22.2 ± 2.9	23.6 ± 3.4*1
喫煙 (%)	58.5	47.6†	10.6	8.5
収縮期血圧 (mmHg)	121 ± 13	161 ± 27*1	118 ± 15	164 ± 26*1
拡張期血圧 (mmHg)	72 ± 10	92 ± 16*1	68 ± 10	90 ± 16*1
糖尿病 (%)	15.6	19.5	12.1	16.6
高コレステロール血症 (%)	29.8	34.7	41.8	54.6*2
高尿酸血症 (%)	13.9	21.1*3	6.5	13.0*3
血清クレアチニン (mg/dL)	0.92 ± 0.22	1.02 ± 0.45*1	0.71 ± 0.19	0.73 ± 0.34

【図6】

遺伝子	多型	Dominant		Recessive		Additive	
		P	オッズ比 (95%信頼区間)	P	オッズ比(95%信頼区間)	P	オッズ比(95%信頼区間)
男性							
ケモカイン受容体2 G-タンパク質β3サブユニット グリコプロテインIa アポリポプロテインC-III	190G→A	0.0471	1.3 (1.0-1.6)	0.0151	1.8 (1.1-2.8)	0.0077	1.9 (1.2-3.0)
	825C→T	0.0235	1.4 (1.0-1.8)	0.0342	1.4 (1.0-1.8)	0.0075	1.6 (1.1-2.3)
	1648A→G	0.7058		0.0266	0.6 (0.4-0.9)	0.7037	
	1100C→T	0.5137		0.0373	0.8 (0.6-1.0)	0.1592	
女性							
腫瘍壊死因子α 腫瘍壊死因子α インスリン受容体サブストレートI グリコプロテインIbα	-238G→A	0.0054	0.3 (0.1-0.7)	0.6903		0.0349	0.3 (0.2-0.9)
	-850C→T	0.3200		0.0354	5.0 (1.4-32.2)	0.0336	5.1 (1.4-32.9)
	3494G→A	0.0462	2.5 (1.1-6.6)	0.8127		0.0631	
	1018C→T	0.0484	0.7 (0.5-1.0)	0.3777		0.0215	0.6 (0.4-0.9)

【図 7】

遺伝子	多型	遺伝子型分布 (%)					
		対照			高血圧例		
男性							
ケモカイン受容体2	190G→A	GG (54.6)	GA (38.9)	AA (6.5)	GG (49.7)	GA (40.1)	AA (10.1)
G-タンパク質β3サブユニット	825C→T	CC (29.9)	CT (48.9)	TT (21.1)	CC (24.0)	CT (50.7)	TT (25.3)
グリコプロテインIa	1648A→G	AA (0.0)	AG (6.6)	GG (93.4)	AA (0.4)	AG (9.3)	GG (90.3)
アポリポプロテインC-III	1100C→T	CC (15.1)	CT (44.6)	TT (40.3)	CC (16.7)	CT (49.3)	TT (34.1)
女性							
腫瘍壊死因子α	-238G→A	GG (94.6)	GA (4.5)	AA (0.9)	GG (97.3)	GA (2.7)	AA (0.0)
腫瘍壊死因子α	-850C→T	CC (75.3)	CT (24.1)	TT (0.6)	CC (71.9)	CT (24.5)	TT (3.6)
インスリン受容体サブストレート1	3494G→A	GG (97.9)	GA (2.1)	AA (0.0)	GG (95.2)	GA (4.4)	AA (0.4)
グリコプロテインIbα	1018C→T	CC (74.5)	CT (23.7)	TT (1.8)	CC (79.7)	CT (18.4)	TT (1.9)

【図 8】

遺伝子	遺伝子座	多型	遺伝モデル	オッズ比	95% 信頼区間
男性					
グリコプロテインIa	5q23-q31	1648A→G	GG versus AA + AG	0.56	0.35-0.91
ケモカイン受容体2	3p21	190G→A	AA versus GG + GA	1.65	1.04-2.60
アポリポプロテインC-III	11q23	1100C→T	TT versus CC + CT	0.73	0.57-0.95
G-タンパク質β3サブユニット	12p13	825C→T	CT + TT versus CC	1.32	0.99-1.74
女性					
腫瘍壊死因子α	6p21.3	-850C→T	TT versus CC + CT	4.63	1.02-20.93
腫瘍壊死因子α	6p21.3	-238G→A	GA + AA versus GG	0.28	0.12-0.66
インスリン受容体サブストレート1	2q36	3494G→A	GA + AA versus GG	2.10	0.83-5.30
グリコプロテインIba	22q11.2	1018C→T	CT + TT versus CC	0.74	0.51-1.09

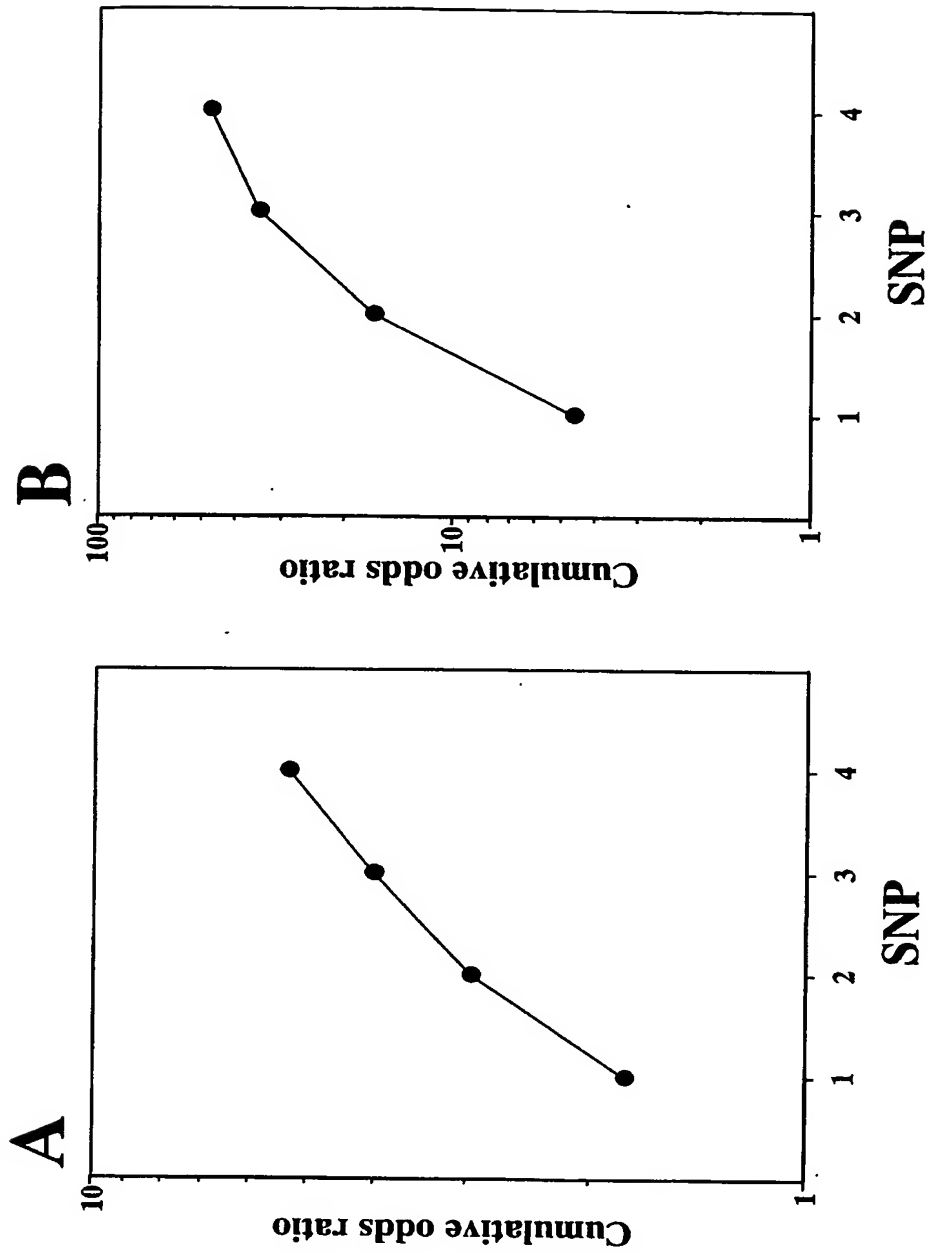
【図 9】

グリコプロテイン _{la} (0 = AA = AG, 1 = GG)	ケモカイン受容体2 (0 = GG = GA, 1 = AA)	アポリポプロテインC-III (0 = CC = CT, 1 = TT)	G-タンパク質β3サブユニット (0 = CC, 1 = CT = TT)	オッズ 比
0	1	0	1	5.34
0	1	0	0	4.05
0	1	1	1	3.90
0	1	1	0	2.95
0	0	0	1	3.24
0	0	0	0	2.45
0	0	1	1	2.36
0	0	1	0	1.79
1	1	0	1	2.98
1	1	0	0	2.26
1	1	1	1	2.18
1	1	1	0	1.65
1	0	0	1	1.81
1	0	0	0	1.37
1	0	1	1	1.32
1	0	1	0	1.00

【図10】

腫瘍壊死因子 α (0 = CC, 1 = TT)	Tu腫瘍壊死因子 α (0 = GG, 1 = GA = AA)	インスリン受容体サブストレート1 (0 = GG, 1 = GA = AA)	グリコプロテインIba (0 = CC, 1 = CT = TT)	オッズ 比
1	0	1	0	46.86
1	0	1	1	34.71
1	0	0	0	22.31
1	0	0	1	16.53
1	1	1	0	13.13
1	1	1	1	9.72
1	1	0	0	6.25
1	1	0	1	4.63
0	0	1	0	10.12
0	0	1	1	7.50
0	0	0	0	4.82
0	0	0	1	3.57
0	1	1	0	2.84
0	1	1	1	2.10
0	1	0	0	1.35
0	1	0	1	1.00

【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高精度で予知確率の高い高血圧の遺伝的リスクを診断する手段を提供する。

【解決手段】 以下の工程を含んでなる方法により高血圧のリスク診断を行う。

(i)高血圧との関連が認められた4個の遺伝子多型より選択される二つ以上の多型を解析する工程、

(ii)前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び

(iii)決定された遺伝子型から高血圧の遺伝的リスクを求める工程。

【選択図】 図11

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-280034
受付番号	50201435885
書類名	特許願
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成14年 9月27日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 9月25日
-------	-------------

次頁無

特願2002-280034

出願人履歴情報

識別番号

[598091860]

1. 変更年月日
[変更理由]

1998年 7月 9日

新規登録

住 所
氏 名

愛知県名古屋市中区栄二丁目10番19号
財団法人名古屋産業科学研究所

特願 2002-280034

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[500572649]

1. 変更年月日 2000年12月14日
 [変更理由] 新規登録
 住 所 岐阜県可児郡御嵩町御嵩字南山2193番地の128
 氏 名 財団法人岐阜県国際バイオ研究所

2. 変更年月日 2003年 5月 9日
 [変更理由] 住所変更
 住 所 岐阜県各務原市那加不動丘1丁目1番地
 氏 名 財団法人岐阜県国際バイオ研究所